

ZUM PROBLEM
DES „UNBALANCED GROWTH“:
VOLUMENBESTIMMUNGEN
UND AUTORADIOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN L-929 ZELLEN
BEI HYDROXYHARNSTOFF-
EXPOSITION

Marco Lörz

Kiss
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT

MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

ZUM PROBLEM DES "UNBALANCED GROWTH":
VOLUMENBESTIMMUNGEN UND AUTORADIOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN L-929 ZELLEN BEI HYDROXY-
HARNSTOFFEXPOSITION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marco Lörz

aus

Lauben/Oberallgäu

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 27.11.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Herrn Prof. Dr. H. Rabes danke ich für die Themenstellung und für seine Betreuung und Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit.

Frau Sickert und Herrn Hampe, vor allem aber Frau Wendt danke ich für ihre Unterstützung.

Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Wilhelm-Sander-Stiftung und der Dr. Mildred Scheel-Stiftung durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

=====

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Zellkultur	4
2.2 Hydroxyharnstoff	6
2.3 Volumenbestimmung	7
2.3.1 Coulter Counter	7
2.3.2 Channelyzer	9
2.3.3 Eichung	10
2.3.4 Messung der L-929 Zellen	12
2.3.5 Auswertung	13
2.4 Autoradiographie	18
2.4.1 Prinzip	18
2.4.2 Methode	19
3. Ergebnisse	21
3.1 Untersuchungen während des 'unbalanced growth'	21
3.1.1 Volumenbestimmungen bei HU-Dauerexposition ..	21
3.1.1.1 Kontrollgruppe	22
3.1.1.2 HU-Konzentration ≥ 1 mM	24
3.1.1.3 HU-Konzentration ≤ 1 mM	28
3.1.1.4 Normalverteilung der Volumenkurven ..	30
3.1.1.5 Diskussion der Ergebnisse	33
3.1.2 Autoradiographische Untersuchungen	
bei HU-Dauerexposition	38
3.1.2.1 Stündliche Markierung mit	
^3H -Cytidin	38
3.1.2.2 Pulsmarkierung mit ^3H -Cytidin	46
3.1.2.3 Diskussion der Ergebnisse	47

3.2 Untersuchungen beim Übergang vom	
'unbalanced' zum 'balanced' growth	51
3.2.1 Vorbemerkung	51
3.2.2 Volumenverteilung nach 24 Stunden	
HU-Dauerexposition (0,5 mM)	52
3.2.3 Autoradiographische Untersuchungen	52
3.2.3.1 Markierung mit ^3H -Thymidin	
(^3H -TdR)	52
3.2.3.2 Markierung mit ^3H -Cytidin	56
3.2.4 Diskussion der Ergebnisse	57
3.2.5 Morphologische Veränderungen nach	
Aufheben des HU-Blocks (0,5 mM)	59
3.2.5.1 Pyknosen	59
3.2.5.2 Mehrkernigkeit	59
3.2.5.4 Diskussion der Ergebnisse	62
4. Gesamtdiskussion	65
5. Zusammenfassung	71
6. Tabellarischer Anhang	73
7. Literaturverzeichnis	85

1. EINLEITUNG

Die Zunahme der Zellgröße ohne die Zunahme der Zellzahl in einem Gewebe ist den Pathologen schon lange als "Hyper-trophie" bekannt (Virchow, 1854).

Der Begriff "Unbalanced Growth" wurde 1954 von Cohen und Barner eingeführt (Cohen und Barner, 1954).

Es handelt sich dabei um einen Zustand, in dem RNA- und Proteinsynthese weiterbestehen, während DNA-Synthese und Mitose gehemmt sind.

Das Ergebnis ist eine beständige Größenzunahme (Volumen-zunahme) der Zelle bis zum irreversiblen Schaden. 'Un-balanced growth' ist sowohl für Prokaryonten (z.B. Cohen und Barner, 1954, Kitching und Fournier, 1975), als auch für Eukaryonten (z.B. Klein und Forssberg, 1954, Cohen und Studzinski, 1967) beschrieben.

Erreichen kann man diesen Zustand (Vorgang) u.a. durch Ver-armen der Zelle an DNA-Prekursoren (z.B. Thymidin: Cohen und Barner, 1954, Rueckert und Mueller, 1960) oder durch selektive medikamentöse Beeinflussung der DNA-Synthese (bei gleichzeitiger Bildung anderer Zellbestandteile). Einen Lite-raturüberblick gibt Ross (1981).

'Unbalanced growth' läßt sich durch Hydroxyharnstoff (HU) induzieren.

HU verhindert die Reduktion der Ribonukleosiddiphosphate (Young et al., 1967, Bono und Wells, 1968, Krakoff et al., 1968, Moore, 1968, Adams et al., 1971, Plagemann und Erbe, 1974, Theiss und Fischer, 1976).

Dieses Enzym katalysiert die Bereitstellung der Deoxyribo-nukleotide für die DNA-Synthese.

Sowohl in vivo als auch in vitro wird die DNA-Synthese durch HU gehemmt (in vitro: Young und Hodas, 1964, Pfeiffer und Tolmach, 1967, Bacchetti und Whitmore, 1969, Wheeler et al., 1972, Bhuyan et al., 1973; in vivo: Schwartz et al., 1965, Yarbo et al., 1965, Rajewsky et al., 1971).

Während der HU-Exposition kommt es zu einer Akkumulierung der Zellen an der G₁/S-Grenze des Zellzyklus. Nach Absetzen des HU wird die Hemmung der Ribonukleosiddiphosphatreduktase aufgehoben und der Eintritt der Zellen in die S-Phase ermöglicht. HU eignet sich daher als Agens zur Induktion einer Synchronisation (in vitro: Adams und Lindsay, 1967, Nias und Fox, 1971, Tobey und Crissmann, 1972; in vivo: Rajewsky et al., 1971, Rabes et al., 1974, 1977).

Die Einwirkung von HU in der S-Phase führt zum Zelltod; nähert sich die Dauer der HU-Einwirkung der Zellzykluslänge, so kommt es ebenfalls zum Zelltod (Sinclair, 1965, 1967, Philips et al., 1967, Kim et al., 1968, Farber und Baserga, 1969, Coyle und Strauß, 1970).

Die Protein- und RNA-Synthese werden durch HU nicht beeinflusst (in vitro: Young und Hodas, 1964, Kim et al., 1965, Pollak und Rosenkranz, 1967, Sinclair, 1967; in vivo: Schwartz et al., 1965, Yarbo et al., 1965, Hill und Gordon, 1968).

Genauere Untersuchungen zum Phänomen des 'unbalanced growth' sind trotz der Fülle der Veröffentlichungen über HU selten (in vitro: Sinclair, 1967, Kim et al., 1968, Ross, 1976, 1981; in vivo: Schmidkonz et al., 1977, Schmidkonz, 1979).

Systematische Untersuchungen über die Auswirkung von HU auf das Zellvolumen fehlen ebenso wie genauere Angaben über das Verhalten von Zellen beim Übergang vom 'unbalanced' zum "balanced growth" (Anderson et al., 1967).

Ziel dieser Arbeit ist es,

- zeit- und dosisabhängige Volumenbestimmungen während und nach HU-Dauerexposition durchzuführen und
- die Volumenbestimmungen durch parallel durchgeführte autoradiographische Untersuchungen der RNA-Synthese während des Zustandes des 'unbalanced growth' zu unterstützen.

Besondere Berücksichtigung finden dabei HU-Konzentrationen, die auf das Zellsystem nicht toxisch wirken und somit nach Absetzen des Blocks den Übergang vom 'unbalanced' zum 'balanced growth' ermöglichen.

Als Versuchsmodell dienen L-929 Zellen. Der Zustand des 'unbalanced growth' wird in dem in vitro System durch HU-Dauerexposition induziert. Die Volumenbestimmung erfolgt mit Hilfe des Coulter Prinzips (Harris, 1959). Die autoradiographischen Untersuchungen werden durch Markierung mit ^3H -Thymidin (DNA-Synthese) und ^3H -Cytidin (RNA-Synthese) durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLKULTUR

Für die Versuche wurden L-929 Zellen verwendet (L-M CCL 1.2, abgeleitet von NCTC Klon 929; Kuchler und Merchant, 1956, 1958; Seromed, München).

Das synthetische Nährmedium TCM 199 (Morgan, Morton und Parker, 1950) lieferte die Firma Difco (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Je 1000 ml Medium enthielten zur Konstanthaltung des pH-Wertes zusätzlich 4,766 g Hepes Puffer (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure) (E. Merck, Darmstadt) und 0,35 g NaHCO_3 . Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,15 erfolgte mit 1 n NaOH.

Pro 1 ml Medium wurden 100 IE Penicillin und 100 IE Streptothemat zugefügt (Grünenthal, Stolberg).

Kurz vor der Verwendung des Mediums erfolgte ein Zusatz von 10 % Kälberserum (v/v). Das Serum wurde im eigenen Labor zubereitet, 30 Minuten bei 56° C inaktiviert und sterilfiltriert (Seitz, 0,2 μ).

Die Zellkultur wurde regelmäßig auf Kontamination durch Bakterien, Pilze und Mycoplasmen geprüft.

Die L-Zellen wuchsen als Monolayerkultur in Glasflaschen mit 40 cm² Oberfläche (Schott, Mainz).

Die Zellen wurden auf folgende Weise subkultiviert bzw. in Suspension gebracht:

- Abpipettieren des Mediums

- Zugabe von so viel angewärmter STV-Lösung (37° C), daß der Zellrasen bedeckt war.

STV: Solution Trypsin-Versen

Herstellung aus 1%iger Trypsin- und
aus 1%iger Versenlösung:

5,0 ml Trypsinlösung (Difco Laboratories,
Detroit, Michigan)

2,5 ml Versenlösung (Serva, Heidelberg)

Versen = Äthylendiamin-
tetraessigsäure.
Na₂-salz

2,5 ml NaHCO₃

90,0 ml CMF-Hanks' Lösung (= Ca und Mg freie Hanks)

Endkonzentration: Trypsin 0,05 %

Versen 0,025 %

pH: 7,4

- Nach 30 s Abpipettieren der STV-Lösung
- Inkubation der Zellkultur bei 37° C für 5 min
- Der Trypsinierungsprozeß war beendet, wenn sich die Zellen von der Oberfläche gelöst hatten (dies konnte makroskopisch beobachtet werden)
- Zugabe von frischem Medium
(um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde das Medium mit einer Pipette mehrmals kräftig durchgespült: alle Zellen sollten sich gelöst haben - die Überprüfung erfolgte lichtmikroskopisch)
- Die so erhaltene Zellsuspension wurde verdünnt und zur erneuten Einsaat oder zu den Messungen verwendet.
- Die Überprüfung der Vitalität erfolgte mit Trypanblau (Phillips, 1973).

Das Verfahren von Hayflick (1973) wurde gering modifiziert: statt einer Trypsin-Konzentration von 0,25 % wurden eine 0,05%ige Trypsin- und eine 0,025%ige Versenlösung benutzt.

Für die Versuche wurden Petrischalen verwendet (Plastic-dishes 100 x 15 mm bzw. 60 x 15 mm, Lux Scientific Corp., Newbury Park).

Alle Manipulationen mit den offenen Zellkulturen fanden in einer Laminar Air Flow Hood statt (Gelaire Laminar Air Flow, Class 100, Fa. Flow, Meckenheim).

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37° C und 5 % CO₂ Atmosphäre (Brutschrank Heraeus B 5060 EK/CO₂, Heraeus, Hanau). Wenn nicht anders vermerkt, befanden sich die Zellen bei den Versuchen in der log-Phase des Wachstums.

2.2 HYDROXYHARNSTOFF

Hydroxyharnstoff (MG 76,1; Boehringer, Mannheim) ist in Wasser bzw. wäßrigen Lösungen gut löslich.

HU in TCM 199 wurde den Zellkulturen in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt. Nach der Exposition wurde das HU-haltige Medium abpipettiert, die Kultur 2 x mit HU-freiem TCM 199 vorsichtig gespült und dann erneut Medium zugegeben, oder die Zellen suspendiert und gemessen. Die HU-haltigen Lösungen wurden jeweils frisch angefertigt, maximal 24 Stunden vor der Verwendung (Aufbewahrung bei +4° C).

Die Endkonzentration des HU schwankte in den verschiedenen Versuchen zwischen 0,1 und 10,0 mM.

2.3 VOLUMENBESTIMMUNG

2.3.1 Coulter Counter -----

Zur Messung der Volumenverteilung wurde ein Coulter Counter Modell ZBI verwendet (Coulter Electronics, Krefeld).

Das Prinzip des Gerätes besteht darin, daß Partikel, die in einem elektrisch leitfähigen Medium aufgeschwemmt sind, durch eine Kapillaröffnung gesaugt werden, deren relative Enge den Gesamtwiderstand eines Gleichstromkreises entscheidend bestimmt (Ruhenstroth-Bauer und Zang, 1960).

Beim Durchtritt eines Partikels durch die Öffnung entsteht eine kurze Widerstandserhöhung in dem System, sofern die Partikel nichtleitend sind, bzw. eine nichtleitende Membran besitzen. Die Größe der Widerstandserhöhung ist der Größe des Partikelvolumens direkt proportional. Der dabei entstandene Impuls wird verstärkt, durch ein Zählwerk registriert und sichtbar gemacht. Zur Berechnung des Volumens geht man davon aus, daß die suspendierten Teilchen annähernd die Form einer Kugel besitzen.

Vor dem Ablösen vom Untergrund haben die L-Zellen eine mehr längliche, flache Form (vergleichbar mit einem Spiegelei). Es konnte gezeigt werden, daß sich das Volumen nicht ändert, wenn die Zellen abtrypsiniert werden und langsam die Form einer Kugel annehmen (Lamb, 1973).

Bei jeder Messung wird mittels eines Quecksilberbarometers eine gleichbleibende Suspensionsmenge durch die Kapillare angesaugt (0,1 oder 0,5 ml); es wird eine Aussage über die Partikelkonzentration möglich. (Nach längerem Stehen war darauf zu achten, daß die zu messenden Teilchen im Meßgefäß nicht zu Boden sanken, sondern eine gleichförmige Suspension vorhanden blieb.)

Um Polarisierungseffekte zu vermeiden, wird der Stromkreis bei jeder Messung umgepolt. Eine variable Verstärkereinstellung erlaubt es, auch sehr kleine Widerstandsänderungen zu registrieren.

Ein Diskriminator, d.h., eine Blende, die alle Impulse abfängt, die kleiner sind, als es dem Schwellenwert (threshold) der betreffenden Blendeneinstellung entspricht, ermöglicht es, durch Serienmessungen bei steigenden Blendeneinstellungen genaue Verteilungskurven der suspensierten Partikel anzufertigen. Dies geschieht jedoch einfacher mit dem Channelyzer.

Für alle Messungen wurden folgende Geräteeinstellungen vorgenommen:

- lower threshold (t_L) : 5
- upper threshold (t_U) : 110
- 1/Amplification : 16
- 1/Aperture Current : 1
(= Aperture Current : 0,5 mA)
- Matching switch : 20 kOhm
- Variable Gain Control: 5
- Separate and
locked switch : "separate"
- Range switch : "extended"

Im Text werden nur davon abweichende Schaltereinstellungen besonders erwähnt.

Wahl der Meßpore:

Partikel mit gegebenem Durchmesser können nur bis zu einer gewissen Größe mit Sicherheit gemessen werden. Ab einem bestimmten Durchmesser der zu messenden Teilchen stimmen die Größe des Signals und das Teilchenvolumen nicht mehr überein, die Teilchen können die Pore sogar verstopfen (Gregg und Steidley, 1965). Die Teilchengröße sollte sich zwischen 10 und 40 % der Porengröße bewegen (Gregg 1965, Instruction Manual for Coulter Counter, 1973).

Für die Versuche wurde daher eine Meßpore mit einem Durchmesser von 100 μ verwendet.

2.3.2 Channelyzer

An den Coulter Counter wurde ein Coulter Channelyzer Modell C-1000 mit XY-Schreiber angeschlossen (Coulter Electronics, Krefeld).

Der Channelyzer ist ein Vielkanalanalysator, der die Daten des Coulter Counters verarbeitet und in 100 Kanäle verteilt. Die Verteilung wird als Histogramm über einen eingebauten Oszillographen sichtbar gemacht. Zählungen pro Kanal oder zwischen zwei Größenbereichen können ausgeführt werden.

Die erhaltenen Volumenverteilungskurven wurden in einem XY-Schreiber (XY-Recorder II, Coulter Electronics, Krefeld) aufgezeichnet.

Folgende Schaltereinstellungen blieben bei den Versuchen konstant:

- Base Channel Threshold (BCT): 5
(BCT: gibt die kleinste Partikelgröße an, die in die Analyse aufgenommen wird)
- Window Width (WW): 100
(WW: gibt an, in welchem Verhältnis die Werte des Coulter Counters im Channelyzer aufgespreizt werden)
- Plot rate: 40
- Edit switch: "on"
(Mit dieser Schaltereinstellung wird jeder verlängerte Impuls verworfen. Ein solcher Impuls kann entstehen, wenn ein Teilchen zu nahe am Rand der Meßpore des Coulter Counters durchtritt, oder wenn zwei Teilchen zu nahe nebeneinander durch die Pore gesaugt werden. Dies würde zu einem zu großen Volumenwert führen.)

Wenn nicht anders erwähnt, wurde eine Messung automatisch beendet, wenn in einem Kanal 999 Teilchen gezählt worden waren (Schaltereinstellung: Count Range: 1 K und Count Control: "Stop at Full Scale").

2.3.3 Eichung

a) Eichung der Geräte

Um zu korrekten und reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen, war es notwendig, die verwendeten Geräte vor der Volumenbestimmung zu eichen.

Es ist wichtig, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen den Schwellenwerten des Channelyzers und der Instrumenteneinstellung des Coulter Counters besteht, und daß die Nullpunkte beider Geräte übereinstimmen.

Das Eichen von Coulter Counter, Channelyzer und XY-Schreiber geschah nach den Anweisungen der Firma Coulter Electronics (Instruction Manual for Coulter Channelyzer, 1976).

Die Eichung wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

b) Eichung mit Latex-Partikeln

Um Aussagen über Volumen und Durchmesser gemessener Zellen machen zu können, muß mit Teilchen bekannten Durchmessers (Volumens) geeicht werden.

Dazu wurden Latex-Partikel (Coulter Electronics, Krefeld) mit einem Durchmesser von $18,26 \mu$ verwendet.

Der Coulter Counter muß nur für eine Größe pro Kapillaröffnung geeicht werden (am besten zwischen 5 und 20 % der Porenöffnung). Im Arbeitsbereich ist eine lineare Antwort zum Partikelvolumen gegeben.

Die Eichung sollte in dem zur Messung verwendeten Elektrolyten erfolgen. Der Eingangsstromkreis der Geräte ist so konstruiert, daß die Eichung weitgehend unabhängig von Temperatureinflüssen und dem Widerstand des Elektrolyten ist.

Beim Channelyzer Modell ZBI genügt es, auf den Modalwert der Latex-Partikel zu eichen.

Die Eichung erfolgte ebenfalls nach den Anweisungen der Firma Coulter (Instruction Manual).

Mit den erwähnten Schaltereinstellungen der Geräte ließ sich eine Eichkurve gewinnen. Aus ihr konnte nach der Formel:

$$\left[\left(\text{Channel No.} \times \frac{WW}{100} \right) + \text{BCT} \right] \times T_F = \text{Cubic Microns}$$

der Eichfaktor (T_F) berechnet werden (Instruction Manual for Coulter Channelyzer, 1976).

Aus diesem ließen sich dann die absoluten Werte der Volumenverteilung folgern.

Es ist zu beachten, daß für jede Instrumenteneinstellung der Eichfaktor neu bestimmt werden muß.

Für die beschriebenen Versuche gilt: $T_F = 88,56$.

Das Volumen der Latex-Partikel beträgt $3188 \mu^3$; $WW = 100$; $\text{BCT} = 5$; Channel No. 31 (relatives Zellvolumen: $31 \hat{=}$ Peak der Volumenverteilungskurve der Latex-Partikel in Kanal 31).

2.3.4 Messung der L-929 Zellen

Die L-Zellen wurden mit STV von den Dishes gelöst (s. 2.1) und im Medium suspendiert.

Da zahlreiche Faktoren wie pH, Zusammensetzung und Zeit in der Suspension sowie die Temperatur die Volumenmessungen beeinflussen können, wurde in Anlehnung an Curtis (Curtis et al., 1973) für die Messungen das Kulturmedium verwendet.

Ein Accuvette-Probenbecher (Coulter-Electronics, Krefeld) wurde mit 15 ml Zellsuspension gefüllt und die Messung möglichst schnell und unter standardisierten Bedingungen durchgeführt.

Es war darauf zu achten, daß nicht mehr als 10^4 Zellen pro ml gemessen wurden, gegebenenfalls wurde verdünnt. Die Meßpore ist auf einem kleinen Monitor sichtbar. Es war daher möglich, den konstanten Teilchenfluß durch die Pore zu beobachten und bei Verstopfung die Messung sofort zu unterbrechen.

Zwischen den Einzelmessungen wurde die Meßkammer gut durchgespült. Die erhaltenen Volumenverteilungskurven wurden mit dem XY-Schreiber aufgezeichnet.

2.3.5 Auswertung

Zur Auswertung von Volumenverteilungskurven stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, die auch in der Literatur angewendet werden:

- einfache graphische Abbildung der Volumenkurven (z.B. Sinclair, 1967, Suzuki et al., 1978)
- Auftragen der kumulativen Häufigkeit (Ordinate) gegen das Volumen (Abszisse) in einem Koordinatensystem (z.B. Reed et al., 1969, Lamb, 1973, Simons, 1973)
- mathematische Beschreibung des Kurvenverlaufs (z.B. Bell und Anderson, 1967).

In der Arbeit wurden die Coulter-Kurven folgendermaßen ausgewertet:

In einem Koordinatensystem wurde die kumulative Häufigkeit (Ordinate) gegen das Volumen bzw. $\ln (= \log_e)$ des Volumens (Abszisse) aufgetragen.

Die Darstellung soll an dem Beispiel der Volumenverteilung einer asynchronen L-929 Population im log-Wachstum erläutert werden:

Die Zellen wurden mit STV von den Dishes gelöst, in Suspension gebracht und mit dem Coulter-Counter mit den gewählten Schaltereinstellungen gemessen.

Dabei ergab sich eine Volumenverteilungskurve entsprechend Abb. 1. Summiert man die absoluten Häufigkeiten in den aufsteigenden Volumenklassen, so erhält man die kumulierte Häufigkeit. Stellt man die kumulierte (relative) Häufigkeit graphisch dar, so erhält man eine sog. Summenkurve (Abb. 2) (Überla, 1976).

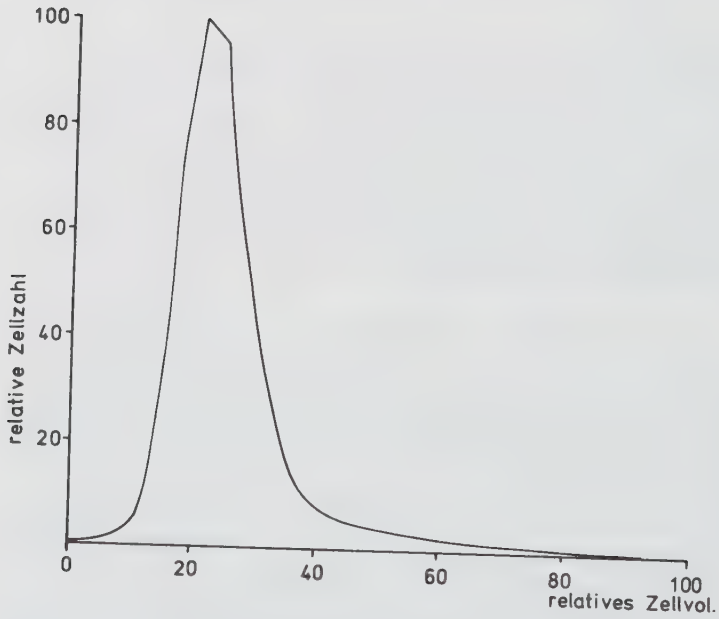


Abb. 1: Coulter-Volumenverteilungskurve
asynchroner L-929 Zellen im
log-Wachstum

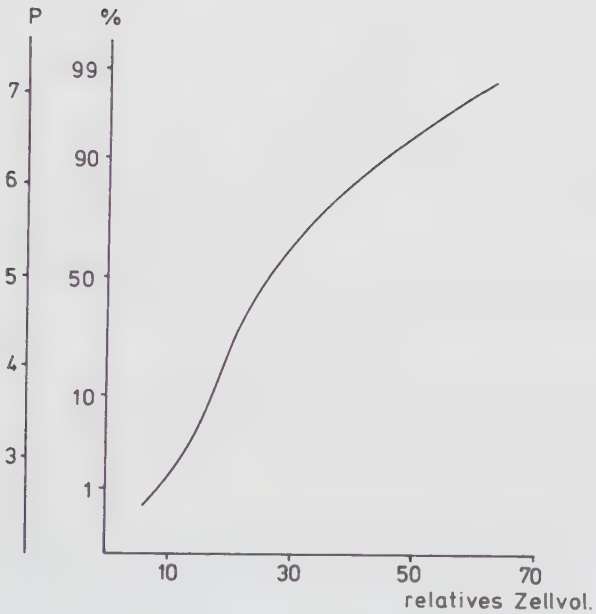


Abb. 2: graphische Darstellung der kumulativen (relativen) Häufigkeit (Summenkurve) des Zellvolumens, berechnet aus dem Kurvenverlauf in Abb. 1.

Abszisse: relatives Zellvolumen

Ordinate: lineare Probitskala (P) und die entsprechenden Prozentwerte (%) der kumulativen Häufigkeit des Zellvolumens.

Aus den so gewonnenen Kurven lassen sich "mode", "median", "mean", die Interdezilbereiche und die Schiefe errechnen.

Für das Beispiel gilt:

- mode	:	1860 μ^3
- median	:	2210 μ^3
- mean	:	2660 μ^3
- Interdezil: 10 %	:	1460 μ^3
90 %	:	3590 μ^3
- Schiefe	:	'linkssteile Verteilung'

Die Schiefe ergibt sich aus den Interdezilbereichen (1 - 9 Dezilkoeffizient der Schiefe, auf Median und Interdezilbereich basierend) (Sachs, 1969).

Dabei gilt:

> 1	:	'rechtssteile Verteilung'
< 1	:	'linkssteile Verteilung'
= 1	:	'symmetrische Verteilung'

Aus den relativen Zellvolumina (Channel No.) lassen sich mit Hilfe der Formel auf Seite 11 die absoluten Volumenwerte berechnen.

Es stellt sich nun die Frage, welchen Parameter man verwenden soll, um ihn als "typischen" Meßwert für die Zellgröße zu benutzen.

Der Modalwert ist der am häufigsten vorkommende Wert. Er entspricht dem Peak in der Coulter-Kurve. Die Bedeutung des Modus liegt vor allem darin, daß er meist der geeignetste Mittelwert ist, um die "normale" "typische" Größe eines Merkmals darzustellen. Der Modus ist von Extremwerten unabhängig. Das Vorhandensein mehrerer Häufigkeitsstellen in einer Verteilung gibt zu der Vermutung Anlaß, daß diese aus heterogenen Teilmassen zusammengesetzt ist, deren typische Werte voneinander verschieden sind. In diesem Fall liefert ein einzelner Modalwert keine sinnvolle Beschreibung.

Der Median wird durch die Rangordnung der Merkmalswerte entsprechend ihrer Größe bestimmt, nicht durch die Größe jedes einzelnen Merkmalswertes. Er gibt nur die Größe des in der Mitte gelegenen Wertes an, ist also von Extremwerten unbeeinflusst. Er kann auch - im Gegensatz zum Modalwert - bei zweigipfeligen Verteilungen informativ sein.

Der Mittelwert gibt den Merkmalswert an, der sich bei gleicher Aufteilung der Merkmalssumme auf die statistische Einheit ergeben würde. Es gehen alle Merkmalswerte ein; er ist also im Gegensatz zu Median und Modus stark von Extremwerten beeinflusst (Hansen, 1974).

Zur Interpretation der Kurven wird daher vor allem der Median verwendet, doch auch der Modalwert und die Interdezilbereiche sind für die Auswertung hilfreich.

Die Interdezilbereiche 10 % und 90 % lassen eine Aussage über die Schiefe der Verteilung zu. Interdezilbereich 90 % bedeutet, daß 10 % der Werte größer und 90 % kleiner sind als der angegebene Wert. Sinngemäßes gilt für den Interdezilbereich 10 %.

Bei der Auswertung wird statt der kumulativen Häufigkeit (im Wahrscheinlichkeitspapier) die Transformation der Ordinate mit Hilfe sog. "Probits" durchgeführt.

Man entnimmt dabei zur beobachteten kumulativen Häufigkeit den zugehörigen Probitwert und zeichnet den entsprechenden Punkt in ein Koordinatensystem, auf dessen Ordinate die Probits linear angeordnet sind (vgl. Abb. 2).

Jeder prozentualen Häufigkeit ist ein Probit zugeordnet und umgekehrt (die Probits werden aus dem Wahrscheinlichkeitsintegral abgeleitet).

Beispiel:

- Probit 5 entspricht der kumulativen Häufigkeit 50 %
- Probit 6 entspricht der kumulativen Häufigkeit 84 %

Die Werte der Probits wurden aus E. Weber 'Grundriß der Biologischen Statistik' (1956) entnommen.

2.4 AUTORADIOGRAPHIE

2.4.1 Prinzip

Beim radioaktiven Zerfall des Atomkerns wird Strahlung emittiert, u.a. α - und β -Strahlen.

Verschiedene organische Verbindungen können mit Tritium, einem reinen β -Strahler, markiert werden. Diese ^3H -markierten Substanzen können bei der Bestimmung von DNA-, RNA- und Proteinsynthese benutzt werden, da sie als Bausteine in die Zelle eingebaut werden.

Für die Autoradiographie beschichtet man markierte und fixierte Präparate mit einer Emulsion. Die photographische Emulsion besteht aus Gelatine mit eingelagerten Silberbromidkristallen. Durch die radioaktive Strahlung kommt es zur Bildung freier Elektronen. Diese Elektronen werden an Stellen, an denen das Gitter der Silberbromidkristalle Unregelmäßigkeiten aufweist, festgehalten. Dadurch werden diese Stellen negativ aufgeladen. Silberionen wandern zu ihnen hin und neutralisieren die Elektronen, so daß metallisches Silber gebildet wird. Dieses sog. "photolytische" Silber bildet das "latente" Bild. Dieses latente Bild kann nun entwickelt werden und erscheint im Lichtmikroskop als Silberkorn. Bei der Fixierung wird das nicht reduzierte Silberbromid in lösliche Komplexverbindungen übergeführt und herausgelöst (Schultze, 1968). Nach der Färbung können die Präparate ausgewertet werden.

2.4.2 Methode

Die L-929 Zellen wurden aus den Glasflaschen mit STV gelöst und in Dishes 'eingesät'. Das 'verbrauchte' Medium wurde zentrifugiert und der Überstand als "konditioniertes" Medium gesammelt.

Pro Dish waren zwei Glasplättchen eingelegt (12 x 50 mm; Vorbereitung: Entfetten mit Äther/Alkohol v/v, 24 hr in 1 n NaOH, Spülen mit Aqua bidest., Heißlufttrocknen und Sterilisieren 3 hr, 130 °C).

In der exponentiellen Phase des Wachstums erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Stoffe:

- Medium abpipettieren und sammeln
- Zugabe der radioaktiven Substanzen in vorgewärmtem Medium (37° C)
- Inkubation bei 37° C im Brutschrank für einen definierten Zeitraum
- vorsichtiges Abpipettieren des radioaktiven Mediums und 2 x Spülen der Dishes mit angewärmtem, konditioniertem Medium
- Zugabe frischen Mediums bzw.
- Entnahme der eingelegten Glasplättchen
- Fixieren der Plättchen (2 x 5 min in eiskalter Hanks-Lösung + 0,01 % der inaktiven Verbindung, die als Tracer verwendet worden war, danach 7 min in Carnoy I (Painter und Drew, 1959) - 3 Teile abs. Alkohol, 1 Teil Eisessig, anschließend 3 x 2 min in abs. Alkohol)
- Lufttrocknen der Plättchen
- Aufbringen der Plättchen auf Objektträger mit der Schichtseite nach oben

Die Autoradiographie wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Wässern der Präparate 3 x 1 Stunde in Aqua dest. mit 0.01 % der inaktiven Verbindung, die als Tracer verwendet worden war
- Lufttrocknung
- Aufbringen der Emulsion im 'Dipping-Verfahren' (Ilford K₂ 1:1 verdünnt; Ilford, Essex)
- Exposition in lichtdichten Kästen bei +4° C
- Entwickeln in Amidol und Fixierung
- Färbung (modifizierte Harrisfärbung: Papanicolaou-Lösung 1:1 mit Aqua dest. verdünnt für 5 - 10 min, anschließend 20 s mit HCl-Alkohol differenzieren)
- Eindecken (Eukitt, Kindler, Freiburg/Brsg.)

Für die Versuche wurden folgende radioaktiv markierte Verbindungen (Amersham-Buchler, Braunschweig) verwendet:

6-³H-Thymidin (spez. Aktivität 5 Ci/mmol)

5-³H-Cytidin (spez. Aktivität 30 Ci/mmol)

Die Expositionsdauer betrug bei der Markierung mit ³H-Thymidin 14 Tage, bei der Markierung mit ³H-Cytidin 24 hr (bei Pulsmarkierung) bzw. 48 hr (nach 20-minütiger ³H-Cytidin-Exposition).

Die Auswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion).

3. ERGEBNISSE

3.1 UNTERSUCHUNGEN WÄHREND DES 'UNBALANCED GROWTH'

3.1.1 Volumenbestimmungen bei HU-Dauerexposition

Zur Volumenbestimmung wurden Kulturen von L-929 Zellen in der exponentiellen Phase des Wachstums (25 - 50 hr nach der Subkultivierung) HU in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die Volumina der Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, im Coulter Counter gemessen.

Die Einzelwerte der Volumenverteilungen finden sich im Anhang (Tab. 1 - 6).

Zur Auswertung und Interpretation wurde nur der Medianwert der Volumenkurven benutzt.

Die Meßpunkte in den Kurven sind Mittelwerte aus 3 - 5 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen den höchsten und den niedrigsten vorkommenden Wert (Variationsbreite bzw. 'range'). Auf Mittelwert $\pm$ Standardabweichung wird wegen der geringen Anzahl von Meßdaten und wegen der Problematik bei der Auswertung der kumulativen Häufigkeitskurven verzichtet, da eine Normalverteilung nicht gesichert werden konnte.

3.1.1.1 Kontrollgruppe (Abb. 3, Tab. 1)

Als Kontrolle für die Versuche dienten unbehandelte, asynchrone L-929 Zellen.

20 Stunden nach der Subkultivierung, also in der log-Wachstumsphase, wurde mit den Volumenbestimmungen begonnen und diese bis zum Erreichen der stationären Phase des Wachstums (Konfluenz) fortgeführt.

Die Messungen wurden parallel zu den mit HU behandelten Versuchsgruppen durchgeführt.

Die Volumenverteilung schwankt in sehr geringen Grenzen. In der log-Wachstumsphase sind die größten Volumenwerte zu finden (rund $2700 \mu^3$). Je mehr sich die Zellen der stationären Phase des Wachstums nähern, umso kleiner wird das Zellvolumen. Der Minimalwert, der so erreicht wird, liegt bei $1300 \mu^3$. Diese Volumenwerte werden weder über- noch unterschritten.

Wird der dichte Monolayer subkultiviert, so kommt es innerhalb von 20 Stunden zur Verdoppelung des Zellvolumens.

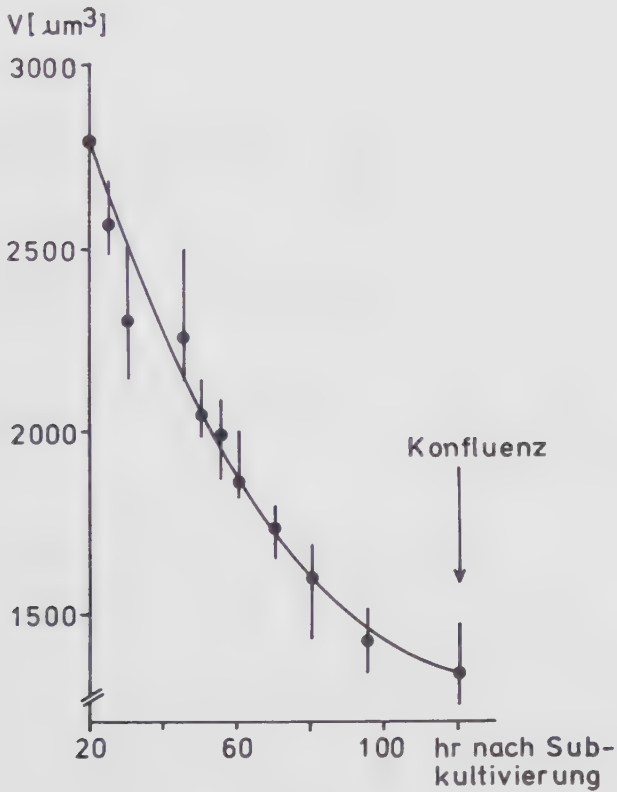


Abb. 3: Volumenverteilung einer unbehandelten L-929 Population 20 hr nach Subkultivierung der Zellen.
Die Meßpunkte sind Mittelwerte des Medians der Coulter-Kurven aus 3 - 5 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Variationsbreite (höchster und niedrigster vorkommender Wert).

3.1.1.2 HU-Konzentration ≥ 1 mM

a) HU-Konzentration 1 mM (Abb. 4, Tab. 2)

Nach Zugabe von 1 mM HU-haltigem Medium zu den asynchronen L-929 Zellen nimmt das Volumen für einen Zeitraum von 25 Stunden annähernd linear zu, dabei gilt $dV/dt = 68 \mu^3/\text{hr}$. Die Zunahme beträgt vom Ausgangswert (V_0) 3,1 %/hr.

Die Volumenvermehrung verlangsamt sich danach, erfolgt aber bis zur 75. Stunde. Sie beträgt dann nur noch $37 \mu^3/\text{hr}$ (1,68 % V_0/hr).

Der zu diesem Zeitpunkt erreichte Wert wird nicht überschritten. Das Volumen nimmt bis auf das 2,4fache des Anfangswertes zu.

Ab der 40. Stunde beginnen die Zellen abzusterben. In den Coulter-Kurven ist dies als Peak in den unteren Kanälen zu erkennen. Dieser Peak wird bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Lichtmikroskopisch handelt es sich um Zellschutt bzw. Zelltrümmer und um tote Zellen. Die Überprüfung der Vitalität erfolgte mit Trypanblau (Phillips, 1973). Der Anteil der abgestorbenen Zellen nimmt laufend zu. In den Coulter-Kurven ist nach 75 hr kein eindeutiger Gipfel (mode) mehr zu sehen, nach 100 hr sind alle Zellen zugrunde gegangen.

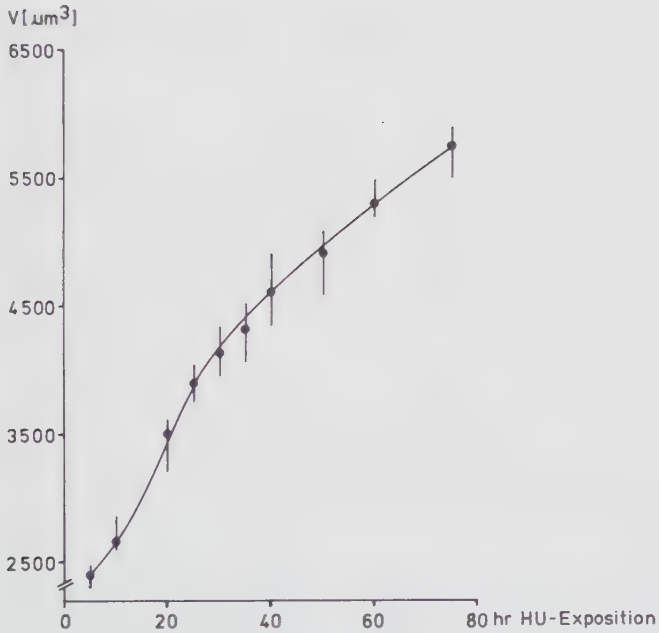


Abb. 4: Volumenverteilung von L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 1,0 mM HU.

Die Meßpunkte sind Mittelwerte des Medians der Coulter-Kurven aus 3 - 5 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Variationsbreite (höchster und niedrigster vorkommender Wert).

b) HU-Konzentration 10 mM (Abb. 5, Tab. 3)

Bei Dauerexposition mit 10 mM HU ergibt sich eine geringfügige Volumenzunahme für die Dauer von 25 Stunden. Das Volumen steigt dabei auf rund $2500 \mu^3$ an und bleibt bei diesem Wert konstant. Das Ausgangsvolumen entspricht dem einer asynchronen Population 50 Stunden nach Einsaat.

Die ersten Anzeichen von Zelltrümmern bzw. toten Zellen sind in den Verteilungskurven 40 Stunden nach HU-Zugabe zu sehen. Im Laufe der Zeit nimmt der Anteil des Zellschutts zu. Nach 60 Stunden sind nur noch wenige lebende Zellen vorhanden. Nach 75 Stunden sind in den Coulter-Kurven nur noch Zellschutt und Zelltrümmer zu erkennen.

c) HU-Konzentration 2 - 6 mM

Für die HU-Konzentrationen von 2,0, 4,0 und 6,0 mM wurden nur einige Kontrolluntersuchungen durchgeführt.

Dabei ergab sich, daß eine HU-Konzentration von 4,0 oder 6,0 mM zu den gleichen Ergebnissen führt wie bei 10,0 mM Lösungen.

Vergleicht man die Volumenverteilung bei Dauerzugabe von 2,0 mM HU mit der von 10,0 mM, so zeigt sich nur ein geringfügig höherer Wert. Das Volumen steigt auf rund $2900 \mu^3$ an. Die Zunahme erfolgt ebenfalls nur für 25 Stunden. Auch bei dieser Konzentration sind um die 40. Stunde die ersten Zelltrümmer bzw. toten Zellen zu sehen. Nach 75 Stunden sind keine lebenden Zellen mehr nachzuweisen.

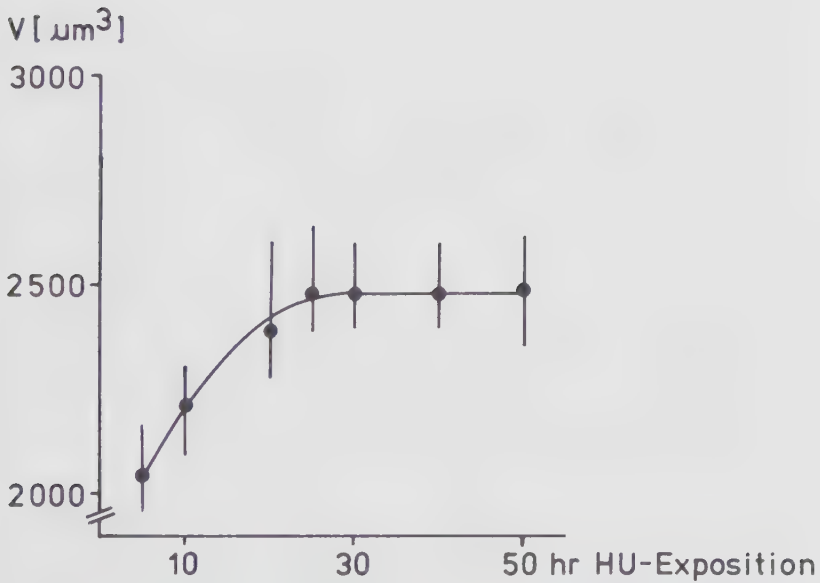


Abb. 5: Volumenverteilung von L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 10,0 mM HU.

Die Meßpunkte sind Mittelwerte des Medians der Coulter-Kurven aus 3 - 5 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Variationsbreite (höchster und niedrigster vorkommender Wert).

3.1.1.3 HU-Konzentration < 1 mM

a) HU-Konzentration 0,5 mM (Abb. 6, Tab. 4)

Bei der Zugabe von 0,5 mM HU-haltigem Medium ergibt sich über einen Zeitraum von 24 Stunden eine lineare Volumenzunahme. Es gilt: $dV/dt = \text{konstant}$.

Danach bleibt das Volumen bei einem Wert von $3700 \mu^3$ für die nächsten 25 Stunden konstant.

Die Volumenzunahme beträgt pro Stunde $67,9 \mu^3$ bzw. $3,3 \%$ vom Ausgangswert ($V_0 = 2070 \mu^3$).

Die Konzentration von 0,5 mM HU ist für die meisten Zellen auf die Dauer letal. Es ergibt sich keine Volumenzunahme mehr, aber nach 75 Stunden sind in den Coulter-Kurven die ersten toten Zellen zu sehen. Im Laufe der Zeit nimmt deren Anteil zu.

b) HU-Konzentration 0,7 mM

Bei dieser HU-Konzentration ergibt sich für die Volumenverteilung während der ersten 40 Stunden kein Unterschied zu den Ergebnissen mit 0,5 mM HU-haltigem Medium. Es erfolgt eine Volumenzunahme bis zur 24. Stunde, und dieser Wert bleibt bis zur 40. Stunde konstant.

Ab diesem Zeitpunkt gleicht das Ergebnis der Wirkung von 1 mM HU. Es tritt in den Coulter-Kurven der erste Zellschutt auf. Nach 75 Stunden sind keine lebenden Zellen mehr vorhanden.

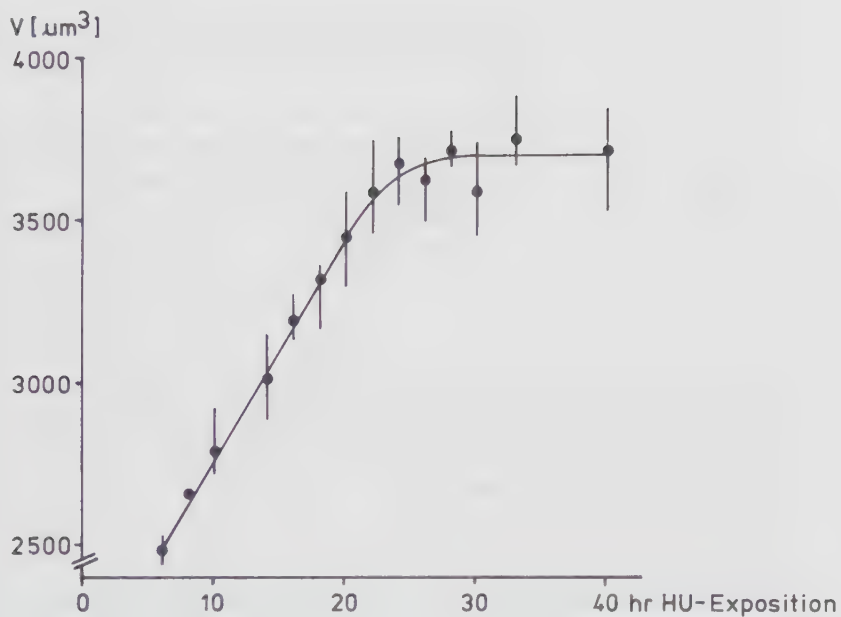


Abb. 6: Volumenverteilung von L-929 Zellen
bei Dauerexposition mit 0,5 mM HU.

Die Meßpunkte sind Mittelwerte des Medians
der Coulter-Kurven aus 3 - 5 Versuchen. Die
Fehlerbalken zeigen die Variationsbreite
(höchster und niedrigster vorkommender Wert).

c) HU-Konzentration 0,1 mM (Tab. 5)

Die Konzentration von 0,1 mM HU hat keinen Effekt auf das Zellvolumen und die Zellzahl. Es findet allenfalls eine gewisse Vergrößerung statt.

Die Volumenverteilung nach 75 Stunden HU-Dauerexposition (0,1 mM) entspricht dem Wert einer unbehandelten L-929 Population rund 50 Stunden nach der Subkultivierung. Die stationäre Phase des Wachstums wird erst später erreicht als bei der Kontrollgruppe.

3.1.1.4 Normalverteilung der Volumenkurven

Bei Dauerexposition mit HU nimmt das Volumen zu. Es kommt jedoch nicht nur zu einer Rechtsverschiebung der Kurven (d.h. Zunahme des Volumens), sondern es tritt auch eine Änderung in der Verteilung auf.

a) Normalverteilung des Volumens

Eine unbehandelte L-929 Population ergibt eine Volumenverteilungskurve wie in Abb. 1 und 2 beschrieben. Bei Normalverteilung des Volumens müßte sich in Abb. 2 eine Gerade ergeben. Dies ist nicht der Fall. Daraus folgt, daß das Volumen nicht normalverteilt ist.

b) ln-Normalverteilung des Volumens

Trägt man dagegen in einem Koordinatensystem die kumulative Häufigkeit (Ordinate) gegen den $\ln (\log_e)$ des Volumens (Abszisse) auf, so erhält man eine Gerade (s. Abb. 7). Der $\ln$ des Volumens ist normalverteilt.

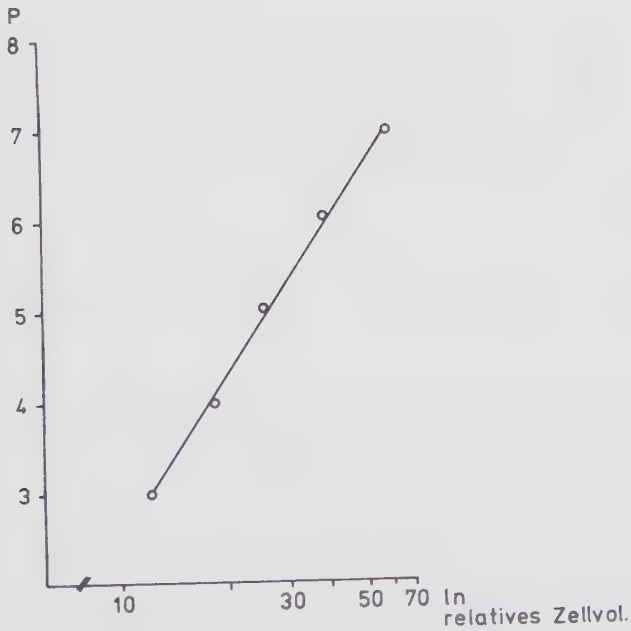


Abb. 7: graphische Darstellung der kumulativen (relativen) Häufigkeit (Summenkurve) des Zellvolumens, berechnet aus dem Kurvenverlauf in Abb. 1

Abszisse: $\ln$ ($\log_e$) des relativen Zellvolumens
Ordinate: lineare Probitskala (P)

c) Dauerexposition mit HU

Unbehandelte Zellen ergeben eine ln-Normalverteilung des Volumens. Nach 30- bis 40stündiger HU-Exposition zeigt sich eine Normalverteilung der Volumenkurven (Schiefe = 1, d.h. symmetrischer Kurvenverlauf!). Zwischen diesen Werten befindet sich eine ganze Schar von Kurven, die sich immer mehr den beiden 'Extremwerten' angleichen.

Je nachdem, ob man auf der Abszisse das Volumen oder den ln des Volumens aufträgt, erhält man einen unterschiedlichen Graphen.

Den Wandel innerhalb der Verteilung kann man so erklären: Die L-929 Zellen werden an der G_1/S Grenze während der HU-Exposition aufgehalten und der Übergang in die S-Phase verhindert. Nur wenige Zellen können diese Grenze überwinden (Bacchetti und Whitmore, 1969).

Die Volumenverteilungskurve ist eine "Selektionskurve": Während bei einigen Zellen die Volumenzunahme sistiert und es zum Zelltod kommt, nimmt bei anderen Zellen das Volumen noch zu. Dies ist abhängig von der Lage im Zellzyklus bei der HU-Zugabe. Mit der Zeit ergibt sich so eine Normalverteilung des Zellvolumens (symmetrischer Kurvenverlauf, vgl. Tab. 1 - 6).

In der Regel sind Häufigkeitsverteilungen von Zellvolumina schief und nicht normalverteilt (Scherbaum und Rash, 1957, Brecher et al., 1962).

Aitchison und Brown (1957) zeigen, daß Populationen log-normal verteilt sind, wenn Fehler multiplikativ und nicht additiv sind (Lamb, 1973). Dies ist für die Volumenverteilung der Fall.

Die Tatsache, daß die Volumenverteilung im Wahrscheinlichkeitspapier eine Gerade ergibt, ist noch kein Beweis für die Normalität; man kann sie jedoch annehmen.

3.1.1.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Bestimmung des Zellvolumens kann durch eine Vielzahl von Methoden erreicht werden, so z.B. quantitative optische Mikroskopie, quantitative Elektronenmikroskopie, Bestimmung der Trockenmasse oder des Zellwassers.

In den vorliegenden Untersuchungen wird das Coulter-Prinzip benutzt. Dabei kann man in sehr kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen untersuchen. Im Vergleich mit den oben aufgeführten Methoden zeigen die Ergebnisse recht genaue Übereinstimmungen.

Die beschriebene Auswertungsmethode ermöglicht eine exakte Analyse der Volumenverteilungskurven. Dies wird nur erreicht, wenn man alle Daten zusammen betrachtet.

Die Volumenkurven können zur Beantwortung der Frage dienen, in welcher Phase des Wachstums sich die Zellen befinden. In der stationären Phase stoppen die L-929 Zellen kurz nach der Mitose in G_1 . In den Versuchen beträgt das Volumen dabei rund $1300 \mu^3$. 20 Stunden nach der Subkultivierung hat sich das Volumen praktisch verdoppelt, und zwar auf $2790 \mu^3$. Die Zellen befinden sich dann in der exponentiellen Wachstumsphase. Je mehr sie sich der stationären Phase nähern, um so kleiner wird das Volumen (Abb. 6).

Es besteht eine umgekehrte Beziehung zwischen der Zelldichte und dem Zellvolumen. Zu diesem Ergebnis kommt auch Lamb (Lamb, 1973).

Betrachtet man die Einzelzelle, so halbiert sie während der Mitose nicht nur ihren DNA-Gehalt, sondern auch ihr Volumen. Es erscheint logisch, daß sie das Volumen bis zur nächsten Mitose wieder verdoppelt haben muß.

Dies geschieht kontinuierlich zwischen dem Beginn von G_1 und G_2 . Hierfür sprechen zahlreiche Untersuchungen (Sinclair und Coleman, 1965, Anderson et al., 1969, Sinclair und Ross, 1969, Blomquist et al., 1971, Micklem und Pasternack, 1975). Neben anderen Daten eignet sich das Volumen daher als Parameter zur Bestimmung der Position der Zelle im Zellzyklus.

Die vorliegenden Untersuchungen ergeben jedoch keine zellzyklusbezogenen Daten, da für die Versuche asynchrone Zellen verwendet wurden.

Bei den unbehandelten Zellen schwanken die Volumenwerte nur in engen Grenzen.

Ist die Zelle in irgendeiner Weise geschädigt und das Verhältnis zwischen Zellwasser und festen Bestandteilen gestört, so ergeben sich bei der Volumenbestimmung falsche Werte. Um dies auszuschließen, wurde die Vitalität der Zellen vor der Messung im Coulter Counter mit Trypanblau bestimmt. Zum Ausschluß von Schwellungseffekten wurde die Osmolarität des Mediums bestimmt. Die Werte (Tab. 7) unterscheiden sich mit und ohne HU-Zusatz kaum. Veränderungen des Volumens können so nicht erklärt werden.

Die Volumenzunahme kann daher als Effekt des HU bezeichnet werden. Geringe HU-Konzentrationen (in den Versuchen 0,1 mM) haben praktisch keine Auswirkung auf die Volumenverteilung bzw. die Zellzahl der verwendeten L-929 Zellen.

Dies gilt offenbar für die meisten in vitro Kulturen (chinesische Hamsterzellen V 79, Sinclair 1967, L 60 T, Bacchetti und Whitmore, 1969, L 5178-Y Lymphomzellen, Rosenberg und Gregg, 1969).

Die vorliegenden Daten ergeben, daß sich verwertbare Volumenzunahmen nur im Bereich zwischen 0,5 und 1,0 mM HU feststellen lassen. Ab einer Konzentration von 4 mM HU

zeigen die L-929 Zellen keine signifikante Volumenveränderungen mehr. Abhängig von der Konzentration wirkt der Hydroxyharnstoff offenbar unterschiedlich schnell toxisch. Bei einer Dauerzugabe von 10 mM sind nach 75 Stunden keine lebenden Zellen mehr zu finden. Bei 100 mM geschieht dies innerhalb von 35 Stunden. Diese Angaben widersprechen der Hypothese, daß der Zelltod von nicht in der S-Phase befindlichen Zellen bei HU-Dauerzugabe nur durch 'unbalanced growth' erfolgt (Sinclair, 1967, Bacchetti und Whitmore, 1969).

Niedrige HU-Dosen (bis 0,5 mM) zeigen bei den meisten Zellen ähnliche Resultate. Die minimal effektive HU-Dosis liegt auch bei anderen Untersuchern bei 0,5 mM (Mohler, 1964, Sinclair 1965, Yarbo et al., 1965, Young et al., 1967, Bacchetti und Whitmore, 1969, Ford und Shackney, 1977).

Unterschiede ergeben sich bei höheren HU-Konzentrationen. Verschiedene Kulturbedingungen und Serumzubereitungen (auch die Wahl des Serums) (Ockey und Allen, 1975) sowie zellspezifische Eigenschaften (Ramseier et al., 1977) können dies erklären.

In der Literatur werden bei in vitro Versuchen teilweise recht hohe HU-Konzentrationen verwendet (Bacchetti und Whitmore (1969) benutzen z.B. eine Dosis von 10 mM, Ford und Shackney (1977) bis zu 50 mM).

Bei Untersuchungen der Auswirkung von HU auf das Zellvolumen werden jedoch immer niedrigere HU-Konzentrationen verwendet; Sinclair (1967) 10^{-3} mM, Kim et al. (1968) 10^{-3} mM, Rosenberg und Gregg (1969) 10^{-3} mM, Ross (1976) 2×10^{-3} mM, Frankfurt (1981) $2,5 \times 10^{-3}$ mM.

Bei der Zugabe von Chemotherapeutika (die eine Volumenzunahme bewirken) variieren die Werte der Volumenzunahme zwischen 1 und 10 % V_0 /hr. Der häufigste Wert liegt bei rund 3,5 % V_0 /hr (Ross, 1981).

Die Volumenzunahme der L-929 Zellen beträgt bei 0,5 mM HU $3,3 \% V_0/\text{hr}$ ($= 67,9 \mu^3/\text{hr}$), bei 1,0 mM HU $3,1 \% V_0/\text{hr}$ ($= 68 \mu^3/\text{hr}$). Der Unterschied ist nicht signifikant. Die eigenen Ergebnisse sind mit denen der Literatur vergleichbar.

0,5 mM HU-Dauerexposition ergibt einen linearen Anstieg des Volumens ($r = 0,99$). Bei einer Konzentration von 1,0 mM HU läßt sich die Frage, ob ein linearer oder exponentieller Anstieg vorliegt, aufgrund der geringen Zahl der Meßpunkte nicht eindeutig beantworten. Rosenberg und Gregg erhalten bei 1 mM HU eine exponentielle Volumenzunahme. Ross beschreibt Linearität.

Bei Rosenberg und Gregg erfolgt die Volumenzunahme 12 Stunden lang. Danach finden sie nur noch eine Volumenzunahme von Zellen, die wahrscheinlich in der S-Phase aufgehalten wurden und eine Konstanz des Volumens bei Zellen an der G_1/S -Grenze. Die eigenen Untersuchungen mit HU-Konzentrationen von 0,5 bzw. 1,0 mM lassen einen solchen Schluß nicht zu.

Die Volumenzunahme (vgl. Tab. 1 - 5) erfolgt nicht durch Verlust kleiner Zellen, sondern durch Größenzunahme der gesamten Population. Während der Zugabe effektiver HU-Dosen sind die Volumenwerte größer als bei den unbehandelten Zellen.

Nach 25 Stunden bleibt das Volumen bei 0,5 mM HU-Dauerexposition über mehr als 30 Stunden konstant, 1,0 mM HU führt zu einer verlangsamten Volumenzunahme.

Als einfachste Erklärung bietet sich an, daß die HU-Wirkung im Laufe der Zeit abnimmt, oder der HU bei 37°C zu einer inaktiven Verbindung zerfällt. Daher kommt es zum Sistieren der Volumenzunahme nach 25 Stunden bei 0,5 mM HU und zu weiterer, jedoch geringerer Volumenzunahme bei 1,0 mM HU. Dies könnte mit den Ergebnissen von Ross übereinstimmen, der bei Zugabe von Bleomycin bzw. Vinblastin zu V 79 Fibroblasten eine quantitative Beziehung zwischen Dosis und

Zellvolumen fand: höhere Dosen ergaben ein größeres Zellvolumen, dies war jedoch mit einer Abnahme der Überlebensrate (gemessen als 'cloning efficiency') verbunden.

Frankfurt (1981) erhielt an HeLa S3 Zellen bei HU-Dauerexposition 16 Stunden lang eine Zunahme des RNA-Gehalts. Danach blieb dieser Wert 24 Stunden konstant. Auch hierfür wäre die Abnahme der HU-Wirkung bzw. ein Zerfall zu einer unwirksamen Verbindung eine Erklärung.

Die Angaben in der Literatur zu diesem Problem sind widersprüchlich.

Wheeler (1971) beschreibt ein Absinken der HU-Konzentration während der Dauerzugabe, Ford und Shackney (1977) können keine Inaktivierung feststellen.

Klarer sind die Verhältnisse in vivo. HU wird im Organismus im Urin ausgeschieden (Adamson et al., 1965, Philips et al., 1967, Fabricius und Rajewsky, 1971) und - hauptsächlich in Leber und Niere - zu Harnstoff reduziert (Adamson et al., 1965, Colvin und Bono, 1970).

Sowohl in vivo als auch in vitro können zellspezifische Unterschiede auftreten.

Zur genauen Überprüfung müßte die HU-Konzentration während der Dauerexposition bestimmt werden.

3.1.2 Autoradiographische Untersuchungen bei HU-Dauerexposition

In den folgenden Versuchen wurde HU 24 Stunden lang in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben und so der Zustand des 'unbalanced growth' induziert. Zu den Volumenbestimmungen wurden parallel autoradiographische Untersuchungen der RNA-Synthese durchgeführt.

3.1.2.1 Stündliche Markierung mit ^3H -Cytidin

Während der Dauerexposition mit 0,5 mM HU wurde in stündlichen Abständen ^3H -Cytidin (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) für 20 min dem Medium zugegeben, die Zellen anschließend fixiert und wie in Abschnitt Material und Methoden beschrieben, weiterbehandelt.

Zur Bestimmung der Silberkornzahl (SKZ) wurden pro Zeitpunkt 200 Zellen randomisiert ausgezählt. Nach 20minütiger Zugabe von ^3H -Cytidin sind die Silberkörner nur über den Kernen zu finden.

Der Markierungsindex der Zellen bleibt im Beobachtungszeitraum konstant.

Nach Abzug des Backgrounds ergab sich während der HU-Exposition ein Ansteigen der SKZ (Abb. 8).

Während der HU-Dauerzugabe (0,5 mM) nimmt das Zellvolumen für rund 25 Stunden linear zu (Abb. 6).

Um zu überprüfen, wie sich die Kernfläche verhält, wurden an den fixierten Präparaten mit einem Videoplangerät (Kontron, München) pro Zeitpunkt die Fläche von 200 Zellkernen ermittelt. Dazu wurde mit einem Meßstift der Kernumfang abgefahren und die Fläche berechnet. Dabei ist von der (nicht exakten) Annahme ausgegangen worden, daß die Kernfläche kreisförmig ist (Abb. 9).

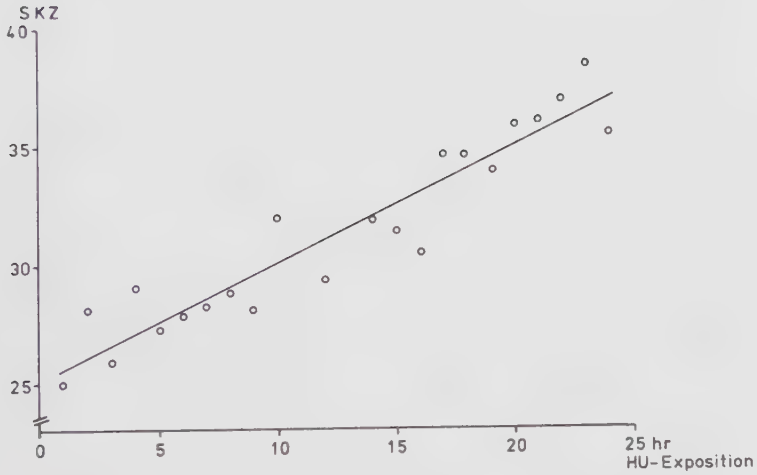


Abb. 8: Silberkornzahl (SKZ) über L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 0,5 mM HU.
In stündlichen Abständen wurde ^3H -Cytidin (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) für 20 min dem Medium zugegeben und die Zellen danach fixiert.

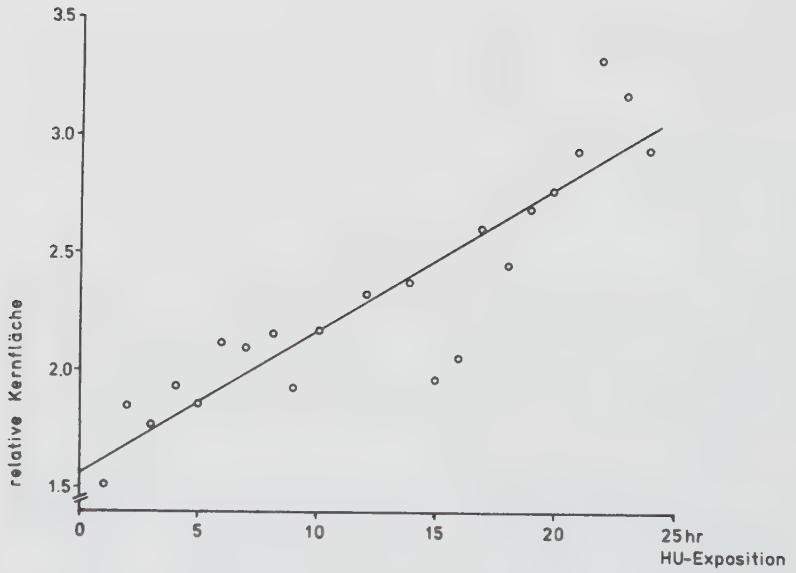


Abb. 9: Relative Kernfläche von L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 0,5 mM HU.

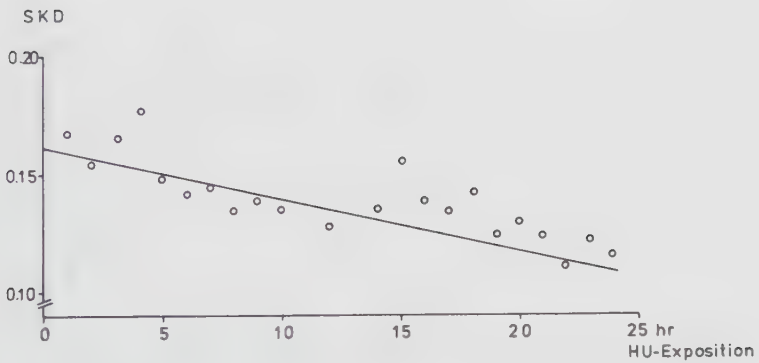


Abb. 10: Silberkorndichte (SKD: Silberkornzahl pro relative Kernfläche) der L-929 Zellen bei HU-Dauerexposition mit 0,5 mM HU.

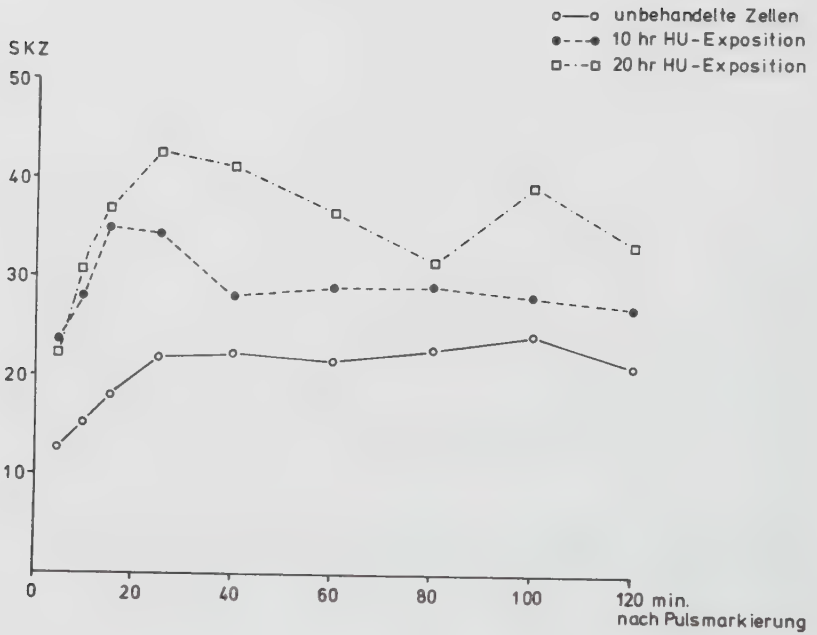


Abb. 11: Silberkornzahl (SKZ) über dem Zellkern von L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 0,5 mM HU.

Für 5 min erfolgte eine Pulsmarkierung des Mediums mit ^3H -Cytidin (3 $\mu\text{Ci/ml}$); danach wurden die Zellen in kurzen Intervallen fixiert.

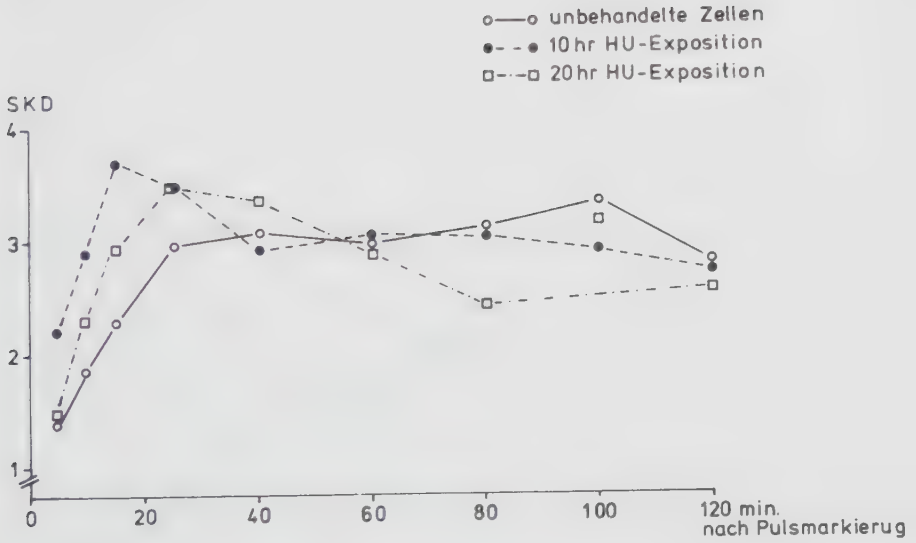


Abb. 12: Silberkorndichte (SKD = Silberkornzahl pro relative Kernfläche) über dem Zellkern von L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 0,5 mM HU.

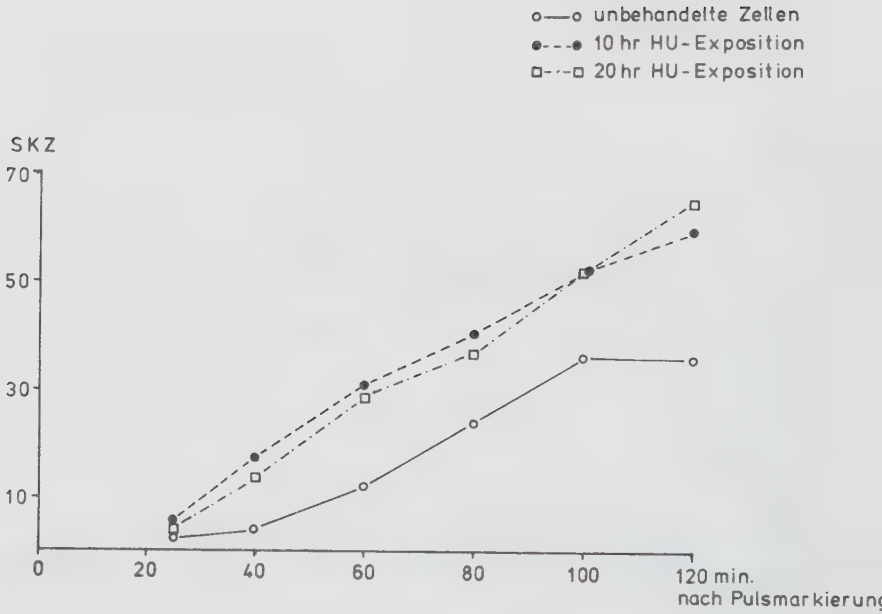


Abb. 13: Silberkornzahl (SKZ) über dem Cytoplasma von L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 0,5 mM HU.

Für 5 min erfolgte eine Pulsmarkierung des Mediums mit ^3H -Cytidin (3 $\mu\text{Ci/ml}$); danach wurden die Zellen in kurzen Intervallen fixiert.

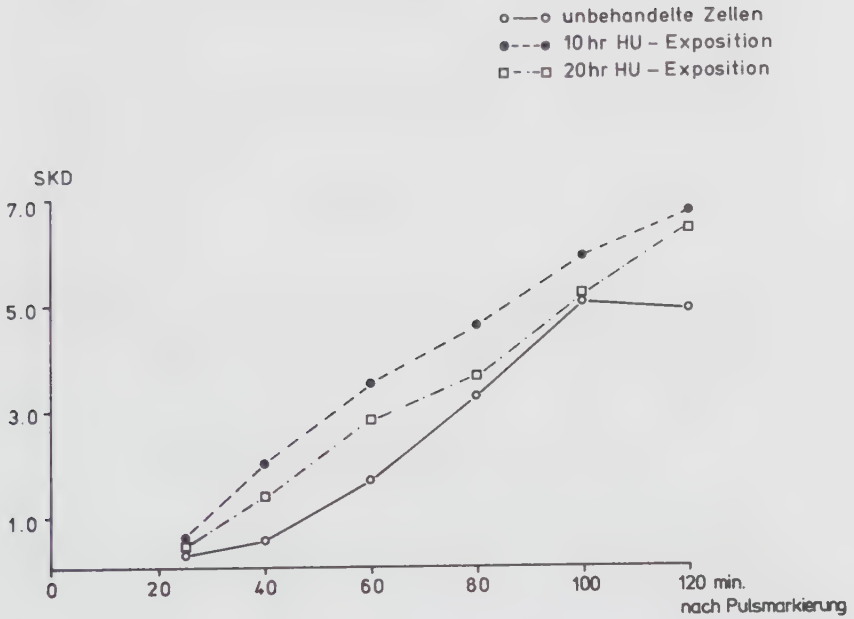


Abb. 14: Silberkorndichte (SKD = Silberkornzahl pro relative Cytoplasmafläche) über dem Cytoplasma von L-929 Zellen bei Dauerexposition mit 0,5 mM HU.

Von der Kernfläche läßt sich indirekt auf das Kernvolumen schließen. Die Kernfläche steigt linear an.

Es läßt sich folgern, daß während des 'unbalanced growth' auch das Kernvolumen zunimmt.

Berechnet man aus der SKZ und der Kernfläche die Silberkorndichte (SKD), so findet sich ein leichtes Absinken während der HU-Dauerexposition (Abb. 10).

3.1.2.2 Pulsmarkierung mit ^3H -Cytidin

Im exponentiellen Wachstum sowie nach 2, 5, 10 und 20 Stunden Dauerexposition mit 0,5 mM HU erfolgte die Zugabe von ^3H -Cytidin für 5 min in einer Konzentration von 3 $\mu\text{Ci/ml}$.

In kurzen Intervallen (nach 4, 9, 15, 25, 40, 60, 80, 100 und 120 min) wurden die Zellen fixiert und wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, weiterbehandelt.

Pro Zeitpunkt wurde an diesen Präparaten bei 100 Zellen die Silberkornzahl getrennt über Nukleolus, Kern und Cytoplasma bestimmt (Tab. 8).

Unmittelbar nach der Pulsmarkierung steigt die Zahl der Silberkörner über dem Kern an und bleibt dann bis zur zweiten Stunde relativ konstant (Abb. 11, Tab. 8). Dies gilt sowohl für die unbehandelten als auch für die mit HU behandelten Zellen.

Nach 20stündiger HU-Gabe scheint die SKZ größer als bei der unbehandelten Gruppe zu sein. Betrachtet man jedoch die geringe Anzahl der ausgezählten Zellen und die Streuung der Meßwerte (Tab. 8), so ergibt sich kein großer Unterschied. Vergleicht man die Silberkorndichte (SKZ/relative Kernfläche), so stimmen die Werte gut überein (Abb. 12).

Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Zählung der SKZ über dem Cytoplasma. Ungefähr 25 min nach der Pulsmarkierung erscheinen die ersten Silberkörner im Cytoplasma, bis zur zweiten Stunde steigt die SKZ an (Abb. 13, Tab. 8). Die Absolutwerte unterscheiden sich nur geringfügig. Betrachtet man ebenfalls die SKD (Abb. 14) (SKZ/relative Cytoplasmafläche; die Fläche wurde aus den Volumenwerten in Abb. 5 berechnet), stimmen die Kurven im Vergleich zu den Werten in Abb. 13 weniger gut überein. Die Streuung ist auch hier sehr groß.

Der Transport der Silberkörner vom Nukleolus zum Cytoplasma (dargestellt als SKZ nach Pulsmarkierung) ist bei den unbehandelten Zellen und während der HU-Dauerexposition gleich.

3.1.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der Autoradiographie sind einige Punkte besonders zu beachten.

³H-Cytidin dient in den vorliegenden Untersuchungen als Prekursor für die autoradiographische Bestimmung der RNA-Synthese. Ein kleiner Teil wird jedoch in die DNA eingebaut. In den ersten 20 bis 30 Minuten nach Beginn der Markierung ist die Inkorporation in die DNA jedoch zu vernachlässigen (Baserga und Malamud, 1969).

Ein Problem ist das Fixieren der Zellen. Abhängig von der verwendeten Methode werden verschiedene Mengen der markierten RNA entfernt. Dies kann sogar in unterschiedlicher Weise Kern und Cytoplasma betreffen (Schneider und Maurer, 1963, Antoni et al., 1965).

Die angegebenen Daten beziehen sich nur auf den von Carnoy nicht herausgelösten Anteil der RNA.

Darüber hinaus muß für quantitative Untersuchungen der Einfluß der β -Selbstabsorption in Betracht gezogen werden, der wegen der unterschiedlichen Dichte der Trockenmasse für einzelne Zellstrukturen nicht immer gleich ist (Maurer-Schultze, 1982).

Bei der Interpretation ist zu berücksichtigen, daß für diese modifizierenden Faktoren keine Korrektur vorgenommen wurde.

Die Zahl der Silberkörner bzw. die Silberkorndichte ist kein quantitatives Maß für die RNA-Synthese-Aktivität; es ist ein Maß für den Einbau von markiertem Cytidin in die RNA. Diese beiden Werte können jedoch nicht gleich gesetzt werden.

Genaue Aussagen über die Beziehungen zwischen ^3H -Cytidin und RNA-Synthese sind nur möglich, wenn die Größe und das Verhalten des Nucleotid-Prekursor-Pools bekannt sind. Trotz dieser Einschränkungen sind quantitative Aussagen über den RNA-Stoffwechsel jedoch möglich.

Die Tatsache, daß radioaktiv markierte Prekursoren der RNA zuerst im Nukleolus erscheinen und dann - in zeitlichem Abstand - im Kern und Cytoplasma, ist schon lange bekannt (Zalokar, 1959). Die autoradiographischen Befunde zeigen den Transport der RNA vom Nukleolus zum Cytoplasma (Maurer-Schultze, 1982).

Während der HU-Dauerexposition, d.h. im Stadium des 'unbalanced growth' ändert sich diese Transportrate nicht, wie sich aus dem zeitlichen Auftreten der Silberkörner über Nukleolus, Kern und Cytoplasma ablesen läßt.

Bei stündlicher Markierung mit ^3H -Cytidin während HU-Dauerexposition ergibt sich ein leichtes Absinken der SKD (Abb. 10). Dies könnte als Absinken der RNA-Synthese während des 'unbalanced growth' gedeutet werden.

Berücksichtigt man jedoch die geringe Anzahl der Meßwerte pro Zeitpunkt (200 Zellkerne), den geringen Unterschied der SKD und die große Streuung der Werte um die Korrelationsgerade ($r = -0,79$), so muß angenommen werden, daß die RNA-Synthese sich nicht signifikant verändert. Diese Folgerung stimmt auch mit den Ergebnissen der Pulsmarkierung überein.

Die SKZ nach Pulsmarkierung mit ^3H -Cytidin differiert bei den unbehandelten und den mit HU behandelten Zellen. In Abb. 12 und 14 werden die Werte der SKD verglichen. Dabei ergibt sich über dem Kern eine sehr gute Übereinstimmung, über dem Cytoplasma scheint dies weniger der Fall zu sein. Die Anzahl der ausgezählten Zellen, die Streuung der Meßwerte, die unterschiedliche Fläche von Kern und Cytoplasma, aber auch Fixationsartefakte können dies erklären. Vergleicht man die SKZ nach der Pulsmarkierung (Tab. 8), so ergeben sich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $\alpha = 0,05$; in Anlehnung an Kreyzig, 1977).

Aus den Ergebnissen läßt sich folgern:

Die SKZ, d.h. der Einbau der Prekursoren in die RNA, steigt während der HU-Dauerexposition an. Betrachtet man jedoch die Fläche der Zellen, bleibt die SKZ, d.h. die SKD konstant. Aus diesen Werten kann auf das Zellvolumen geschlossen werden. Der Einbau von ^3H -Cytidin erhöht sich mit dem ansteigenden Zellvolumen.

Schneider und Maurer (1963) stellten fest, daß innerhalb einer Zellart die - autoradiographisch erfaßbare - RNA-Synthese dem Kernvolumen der einzelnen Zelle proportional ist. Frankfurt (1981) zeigte mit flußcytometrischen Untersuchungen an HeLa S3 Zellen eine Zunahme des RNA-Gehaltes bei HU-Dauerzugabe. Er korrelierte seine Ergebnisse nicht mit dem Zellvolumen.

Das Hauptproblem bei der Interpretation der autoradiographischen Untersuchungen liegt in den möglicherweise veränderten Prekursor-Pools.

HU verhindert die Reduktion der Ribonukleosiddiphosphate (Young und Hodas, 1964, Young et al., 1967, Krakoff et al., 1968, Moore 1969, Theiss und Fischer, 1976). Dabei kommt es zur Veränderung der zellulären Prekursor-Pools.

Adams und Mitarbeiter (1971) zeigten an L-929 Zellen, daß bei HU-Dauerexposition (2 mM) die Pools der Purindeoxyribonukleosidtriphosphate absinken, während die Pyrimidineoxyribonukleosidtriphosphat-Pools ansteigen.

Das Ansteigen des dCTP-Pools bei HU-Gabe wird von anderen Untersuchern bestätigt (Walters et al., 1973, Plagemann und Erbe, 1974). Skoog und Bjursell (1974) fanden allerdings ein Absinken des dCTP-Pools.

Bei Zunahme des dCTP Prekursor-Pools während der HU-Exposition würde sich in den Versuchen bei Zugabe von ^3H -Cytidin ein "Verdünnungseffekt" ergeben. Unter dieser Voraussetzung wäre dann die RNA-Synthese während des 'unbalanced growth' erhöht. Um dies genau festzustellen, müßte man - wie eingangs erwähnt - die Prekursor-Pools bestimmen.

Aus den vorliegenden Daten und den in der Literatur beschriebenen Befunden über die Veränderung der RNA-Prekursor-Pools läßt sich folgern, daß die RNA-Synthese bei HU-Dauerexposition zumindest nicht abnimmt.

Die RNA-Syntheseaktivität kann man mit gewissen Einschränkungen mit der Proteinsyntheseaktivität korrelieren. Berücksichtigt man diese Beziehungen, so läßt sich aus den hier vorgelegten Ergebnissen indirekt auf eine Zunahme des Proteingehaltes der Zelle schließen.

Die beobachtete Zunahme des Zellvolumens bei HU-Dauerexposition wäre demnach als Ergebnis biologisch relevanter Synthesen der Zelle zu deuten.

3.2. UNTERSUCHUNGEN BEIM ÜBERGANG VOM 'UNBALANCED' ZUM 'BALANCED GROWTH'

3.2.1 Vorbemerkung -----

Aus den bisher vorgelegten Ergebnissen ist zu sehen, daß das Phänomen des 'unbalanced growth' durch HU nur in einem sehr kleinen Dosisbereich ausgelöst werden kann.

Konzentrationen unter 0,5 mM ergeben ebenso wie Konzentrationen über 2,0 mM keine Zunahme des Zellvolumens.

Nach 12 Stunden Dauerexposition mit HU (1,0 mM) ist die Volumenzunahme noch nicht sehr ausgeprägt. Wird zu diesem Zeitpunkt der HU-Block aufgehoben, so zeigt sich keine weitere Einwirkung auf das Verhalten der Zellkultur. 24stündige Zugabe von HU (1,0 mM) schädigt die Zellen bereits so, daß nach Absetzen des HU kein Übergang mehr zum 'balanced growth' möglich ist. 25 Stunden entsprechen ungefähr der Dauer einer Zellzykluslänge.

12- oder 24stündige Dauerzugabe mit 0,5 mM HU schädigt dagegen die Zellen nicht. Der Übergang zum 'balanced growth' ist möglich. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche eine HU-Konzentration von 0,5 mM gewählt.

Man muß dabei in Kauf nehmen, daß der HU-Block nicht vollständig ist. Dies erschwert natürlich die Interpretation der Ergebnisse.

3.2.2 Volumenverteilung nach 24 Stunden

HU-Dauerexposition (0,5 mM)

Nach 24stündiger Dauerexposition mit 0,5 mM HU wurde nach zweimaligem vorsichtigen Spülen frisches Medium zugegeben, und so der HU-Block aufgehoben.

In regelmäßigen Abständen erfolgte dann die Bestimmung der Volumenverteilung (Abb. 15, Tab. 6).

Nach Ende der HU-Zugabe ist in den ersten 7 Stunden noch eine geringe Volumenzunahme zu erkennen (von $3640 \mu^3$ auf $3860 \mu^3$). Anschließend sinkt das Volumen bis zur 11. Stunde steil ab ($2200 \mu^3$). Es folgt eine geringe Zunahme auf $2500 \mu^3$.

Zwischen der 22. und 26. Stunde nimmt das Volumen nochmals ab, und zwar auf rund $1900 \mu^3$. Dieser Wert bleibt für 14 Stunden etwa konstant.

3.2.3 Autoradiographische Untersuchungen

3.2.3.1 Markierung mit ^3H -Thymin (^3H -TdR)

In Abständen von 1 Stunde nach Aufheben des 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM) erfolgte für 20 Minuten die Markierung mit ^3H -TdR (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$).

In den Präparaten wurden pro Zeitpunkt 1000 Zellen ausgezählt und der Markierungs- und Mitoseindex bestimmt (Abb. 16).

Der Markierungsindex (Anteil der ^3H -TdR markierten Zellen) liegt 1 Stunde nach Aufheben des Blocks bei 85 %. Er sinkt bis zur 11. Stunde auf rund 28 % und steigt dann bis zur 18. Stunde wieder an.

Ein nahezu inverses Verhalten zeigt der Mitoseindex: Es findet sich ein schmaler Peak zwischen der 7. und 11. Stunde und ein breiterer Peak zwischen der 21. und 25. Stunde.

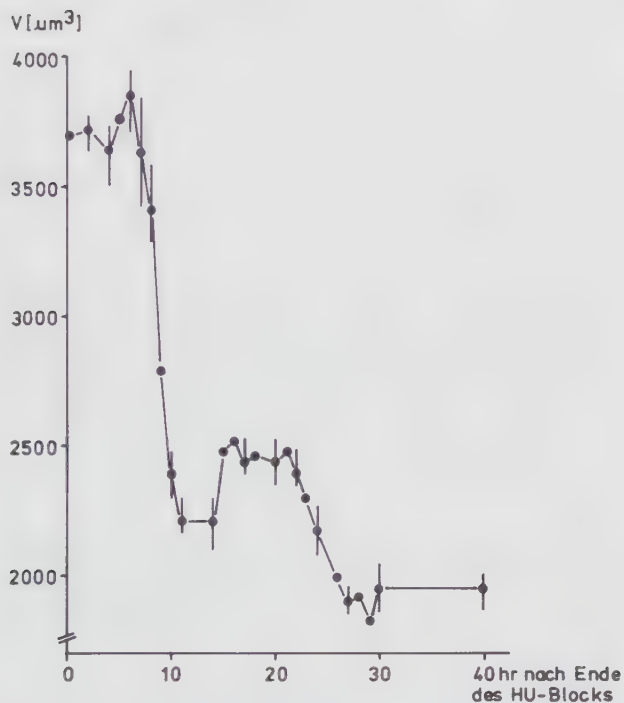


Abb. 15: Volumenverteilung von L-929 Zellen nach Aufheben eines 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM).

Die Meßpunkte sind Mittelwerte des Medians der Coulter-Kurven aus 3 - 5 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die Variationsbreite (höchster und niedrigster vorkommender Wert).

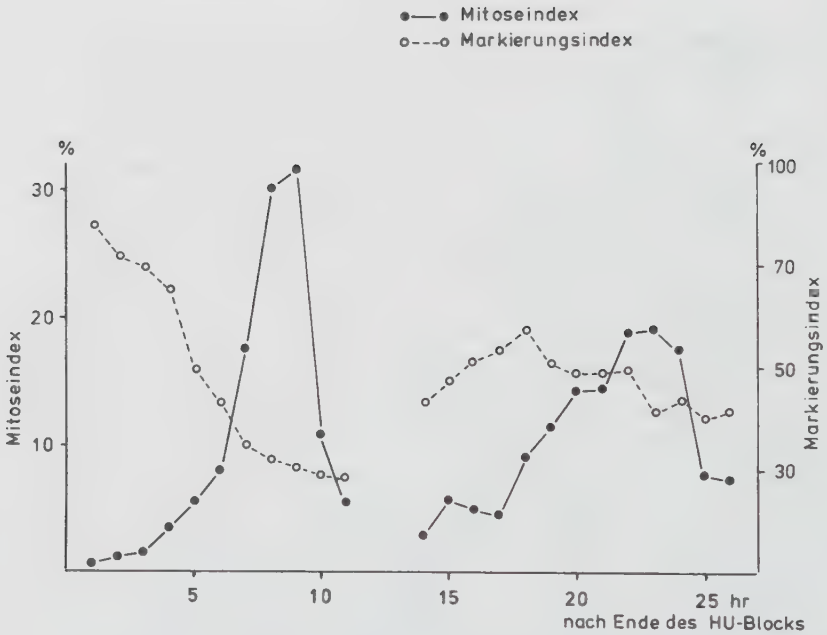


Abb. 16: Mitose- und Markierungsindex von L-929 Zellen nach Aufheben eines 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM).

In stündlichen Abständen nach Aufheben des Blocks erfolgte für 20 min eine Markierung des Mediums mit ^3H -Thymidin (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$); danach wurden die Zellen fixiert und der Markierungs- und Mitoseindex an 1000 Zellen bestimmt.

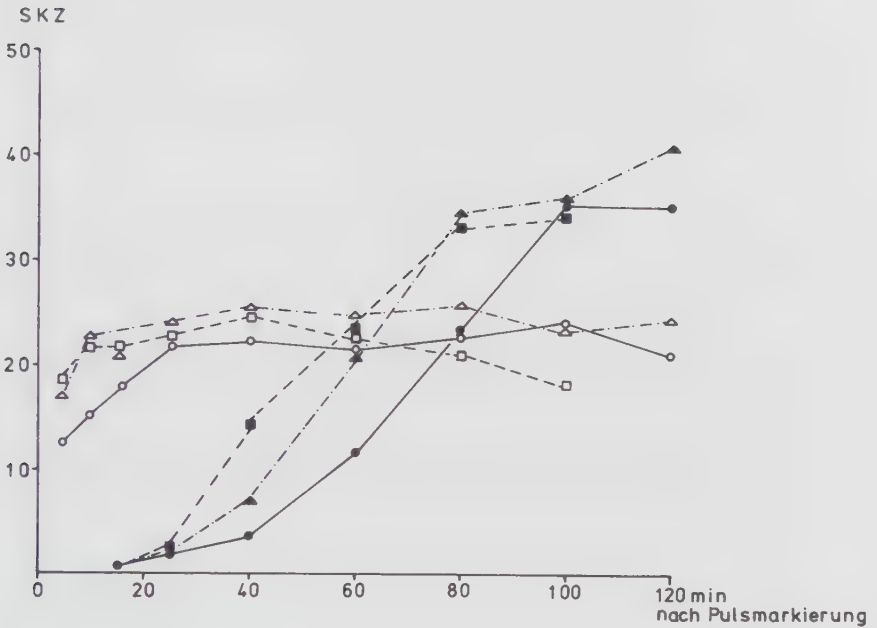


Abb. 17: Silberkornzahl (SKZ) über Zellkern und Cytoplasma von L-929 Zellen 9 bzw. 14 hr nach Aufheben eines 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM).

Für 5 min erfolgte eine Pulsmarkierung des Mediums mit ^3H -Cytidin (3 $\mu\text{Ci/ml}$); danach wurden die Zellen in kurzen Intervallen fixiert.

SKZ über dem Zellkern:

- unbehandelte Zellen
- 9 hr nach Aufheben des HU-Blocks
- △-·-·-△ 14 hr nach Aufheben des HU-Blocks

SKZ über dem Cytoplasma:

- unbehandelte Zellen
- 9 hr nach Aufheben des HU-Blocks
- ▲-·-·-▲ 14 hr nach Aufheben des HU-Blocks

3.2.3.2 Markierung mit ^3H -Cytidin

9 bzw. 14 Stunden nach Aufheben des 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM) erfolgte mit ^3H -Cytidin 5 Minuten lang eine Pulsmarkierung (3 $\mu\text{Ci/ml}$). Danach wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen fixiert.

Die Bestimmung der SKZ über Nukleolus, Kern und Cytoplasma erfolgte bei 100 Zellen (vgl. 3.1.2.2).

Für beide Zeitpunkte nach Aufheben des Blocks ergibt sich sowohl für Zahl, als auch für Verteilung der Silberkörner kein Unterschied (Abb. 17).

In Abb. 17 ist zum Vergleich der Kurvenverlauf der unbehandelten Kontrolle (= exponentielles Wachstum) mit eingezeichnet.

Die Zellvolumina 9 und 14 Stunden nach dem Block unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander (Tab. 6).

3.2.4 Diskussion der Ergebnisse

Auch während der 0,5 mM HU-Dauerexposition durchlaufen einige Zellen den 'normalen' Zyklus.

Nach Aufheben des Blocks handelt es sich daher nur um ein teilsynchronisiertes System. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten.

Nach Aufheben des Blocks nimmt die Markierung mit ^3H -Thymidin ab, der Mitoseindex zeigt zwischen der 7. und 11. Stunde einen scharfen Peak. Der zweite Mitosepeak (22 Stunden nach dem Block) und die ^3H -Thymidin-Markierung sind nicht mehr so ausgeprägt.

Die Werte gleichen danach immer mehr denen einer unbehandelten, asynchronen L-929 Population.

Das Zellvolumen bildet bis zur 6. Stunde nach Aufheben des Blocks eine Art Plateau (die Zellen müssen nach dem Block noch die S- und die G_2 -Phase durchlaufen). Erst zwischen der 7. und 11. Stunde, also zum Zeitpunkt der größten Mitoseaktivität, nimmt es ab. Der Median der Volumenwerte sinkt dabei von $3630 \mu^3$ auf $2210 \mu^3$. Das Volumen wird offenbar nicht genau halbiert.

Bei den gewählten Geräteeinstellungen von Coulter Counter und Channelyzer (s. Material und Methoden) stoppt die Messung automatisch, wenn in einem Kanal 1000 Zellen gemessen worden sind. Die (angedeutet) doppelgipfelige Kurve läßt sich in diesem Fall besser durch den Modalwert charakterisieren. Vergleicht man diese Werte (Tab. 6), so ergibt sich 7 Stunden nach dem HU-Block ein Zellvolumen von $3880 \mu^3$ und 11 Stunden nach dem Block ein Volumen von $1860 \mu^3$.

Dies entspricht der erwarteten Halbierung des Zellvolumens. Das Volumen halbiert sich also bei der Zellteilung und gleicht sich schrittweise den Werten einer unbehandelten Kontrollpopulation an. Dies erklärt den sägezahnartigen Verlauf der Volumenverteilungskurve.

Die Markierung mit ^3H -Cytidin zeigt 9 und 14 Stunden nach dem Block sowohl über dem Kern als auch über dem Cytoplasma gleiche Ergebnisse (t-Test: kein signifikanter Unterschied).

Die Zellvolumina unterscheiden sich ebenfalls nur geringfügig. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ergeben sich die gleichen Resultate.

Daraus läßt sich folgern, daß 14 Stunden nach Aufheben des HU-Blocks (d.h. nach einer Zellteilung) die RNA-Synthese auf das normale Maß reduziert wurde.

Dies scheint in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen von Frankfurt (1981, 1982) zu stehen, der nach HU-Dauerexposition an HeLa S3 Zellen beim Übergang zum 'balanced growth' auch in den Tochterzellen einen erhöhten RNA-Gehalt feststellt. Frankfurt bestimmt den relativen RNA-Gehalt der Zellen und macht keine Aussagen über das Zellvolumen. Der RNA-Gehalt kann auch nicht mit der RNA-Synthese gleichgesetzt werden. Daher widersprechen sich die Ergebnisse nicht.

Das Zellvolumen, die ^3H -Cytidin-Markierung (RNA-Synthese) und die ^3H -Thymidin-Markierung (DNA-Synthese) geben ein recht gutes Bild über das Verhalten der Zellen nach dem Aufheben des HU-Blocks.

Ein schneller Übergang vom 'unbalanced growth' zu den normalen Verhältnissen ist möglich. Dies wurde auch bei anderen Zellarten nachgewiesen (in vitro: Lambert und Studzinski, 1967, Rønning und Seglen, 1982; in vivo: Rabes et al., 1977, Schmidkonz, 1979).

Zu beachten ist jedoch, daß 'unbalanced growth' und der Übergang zum 'balanced growth' nur erfolgen, wenn toxische Effekte des HU nicht überwiegen.

3.2.5 Morphologische Veränderungen nach Aufheben des HU-Blocks (0,5 mM)

Um die morphologischen Veränderungen nach Aufheben des HU-Blocks zu bestimmen, wurden die Präparate aus dem Versuch 3.2.3.1 (stündliche Markierung mit ^3H -Thymin) ausgewertet.

An 1000 Zellen pro Zeitpunkt wurde der relative Anteil von Zellen mit Pyknosen und die Mehrkernigkeit bestimmt.

3.2.5.1 Pyknosen

Der Anteil der pyknotischen Zellen (Abb. 18) beträgt bei unbehandelten Zellen 0,5 %. Während des HU-Blocks kommt es zu einem Anstieg auf 1,7 %.

Nach Aufheben des Blocks ergibt sich in den ersten 20 Stunden eine Zunahme auf ungefähr 5 %. Danach bleibt dieser Wert konstant.

Eine mögliche Ablösung pyknotischer Zellen während der Fixierung wurde dabei nicht berücksichtigt.

3.2.5.2 Mehrkernigkeit

Die unbehandelten L-929 Zellen haben einen Anteil von 1 % mehrkernigen Zellen.

Während des 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM) steigt dieser Anteil auf ungefähr 2,5 %.

Nach Aufheben des Blocks ergibt sich eine Zunahme der mehrkernigen Zellen auf rund 13 % (Abb. 19).

Bis zur 6. Stunde nach Blockende nimmt der Anteil geringfügig zu (von 2,5 % auf 6 %). Zwischen der 7. und 12.

Stunde verdoppelt er sich. Dieser Wert bleibt auch nach der zweiten Zellteilung konstant (bis 30 Stunden nach Blockende).

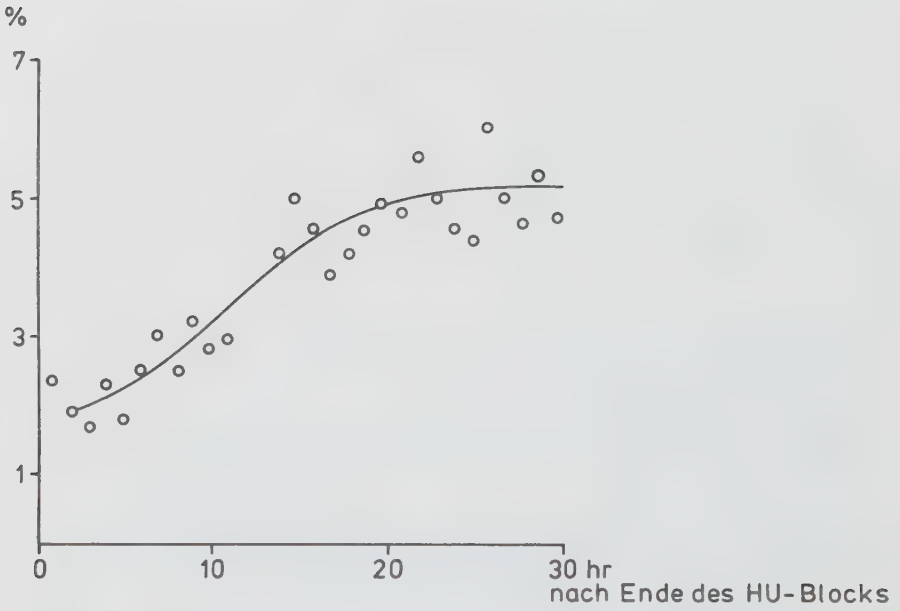


Abb. 18: Anteil an pyknotischen Zellen nach Aufheben eines 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM).

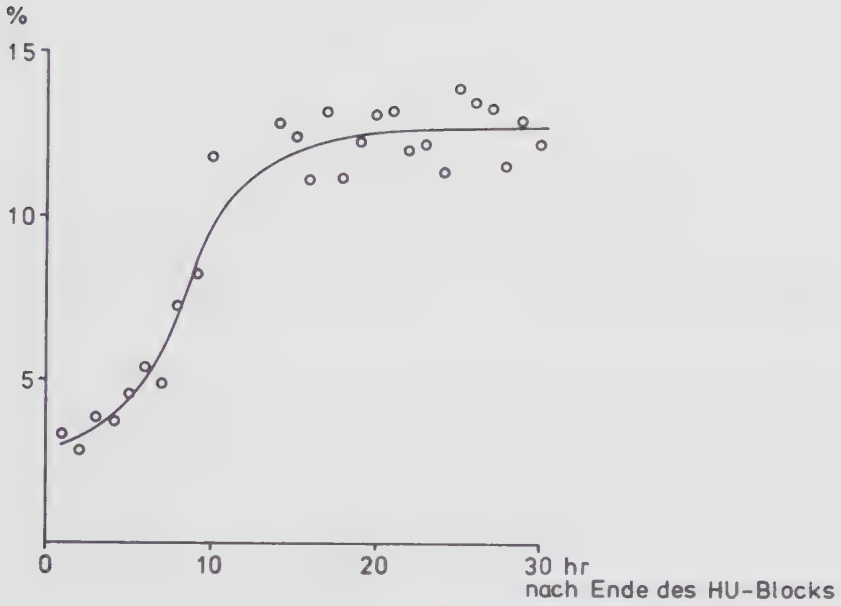


Abb. 19: Anteil an mehrkernigen Zellen nach Aufheben eines 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM).

3.2.5.4 Diskussion der Ergebnisse

L-929 Zellen sind als permanenter Stamm recht genau charakterisiert. Sie werden im eigenen Labor seit Jahren in Kultur gehalten, ohne daß sich wesentliche Änderungen im Wachstumsverhalten und der Struktur feststellen ließen.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf Kontaminationen überprüft. Atypische Reaktionen mycoplasma-infizierter Zellkulturen sind beschrieben (Grüneisen et al., 1975).

Die einzige Manipulation in den Versuchen bestand in der Zugabe bzw. Wegnahme des HU. Die beobachteten Veränderungen sind daher durchaus als Folge der HU-Exposition anzusehen.

Pyknosen in den fixierten Präparaten sind natürlich nur ein sehr ungenauer Wert für den Zelltod. Ein besseres Kriterium wäre die Abnahme der 'cloning efficiency' (Kim et al., 1965). Allerdings können die Zellen, wenn sie dem 'unbalanced growth syndrome' ausgesetzt waren, bei den zur Feststellung der 'cloning efficiency' nötigen Arbeitsschritten (Ablösen vom Kulturgefäß, Suspendieren und erneute Einsaat) geschädigt werden. Es zeigt sich dann ein relativ zu niedriger Wert, da ein großer Teil der Zellen ohne die Clonierungsschritte lediglich nach Austausch des Mediums ein normales Wachstums- und Proliferationsverhalten zeigen (Lambert und Studzinski, 1967).

Ob der Zelltod durch Apoptose (Kerr et al., 1972) verursacht wird, wie es Taylor und Mitarbeiter (1981) beim Methotrexat-induzierten 'unbalanced growth' beschreiben, läßt sich an den Präparaten nicht entscheiden.

Das auffälligste Ergebnis der morphologischen Untersuchungen nach Aufheben des HU-Blocks (0,5 mM) ist der erhöhte Anteil an mehrkernigen Zellen.

Als Ursache hierfür kommen unvollständige Mitose oder Zellfusion in Betracht.

Dem langsamen Anstieg des Prozentsatzes an mehrkernigen Zellen während und für 7 Stunden nach dem Block folgt eine Verdoppelung des Anteils (von 6 % auf 12 %) innerhalb von 3 Stunden. In diesem Zeitraum ist auch der größte Anteil der Mitosen zu sehen (s. Abb. 16). Dies spricht für Entstehung der Mehrkernigkeit durch unvollständige Mitose.

Gegen eine Zellfusion spricht, daß mehrkernige Zellen bei unbehandelten Populationen in dieser Größenordnung nicht vorkommen. Für eine fusionsfördernde Wirkung des HU gibt es keine Anhaltspunkte, da die Mehrkernigkeit erst in längerem Intervall nach Absetzen der HU-Exposition verstärkt auftritt.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der L-Zellen ist eine einfache Methode, um grobe morphologische Veränderungen festzustellen. Genauere Untersuchungen müßten elektronenmikroskopisch erfolgen, so um beispielsweise die Frage zu klären, wie sich Mitochondrien, Microbodies und endoplasmatisches Retikulum verhalten.

Schmidkonz (1979) hat dies an einem in vivo System untersucht. Er beschreibt nach partieller Hepatektomie der Rattenleber und Gabe von HU eine unterschiedliche Vergrößerung bzw. Vermehrung verschiedener Zellbestandteile. Das Ausmaß läuft dabei der Dauer der DNA-Synthese-Hemmung teilweise parallel.

Mit den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß die L-Zellen in der Lage sind, den Zustand des 'unbalanced growth' und den Übergang zum 'balanced growth' ohne wesentliche morphologische Schädigungen zu durchlaufen.

Der erhöhte Anteil an mehrkernigen Zellen (und somit die unvollständige Mitose) könnte möglicherweise als direkter Effekt des HU auf die DNA interpretiert werden.

Hierfür sprechen Ergebnisse von Yu und Sinclair (1968), die zeigten, daß es nach HU-Exposition zu Chromosomenaberrationen sowie zu abnormen Mitosen (Sinclair, 1967) kommen kann. Andere DNA-Veränderungen (wie Strangbrüche und Neusynthese abnorm kleiner DNA) wurden von Coyle und Strauß (1970) beschrieben.

Horáková und Mitarbeiter (1974) induzierten an HeLa Zellen durch Gabe von 6-Mercaptopurin den Zustand des 'unbalanced growth'. Sie fanden während, vor allem aber nach Exposition mit diesem Stoff eine Zunahme des Anteils an zwei- und mehrkernigen Zellen. Riches und Harrap (1973) beobachteten an Yoshida Ascites Zellen nach Exposition mit Chlorambucil (Leukeran) einen Anstieg des Quotienten Nicht-Histon-Protein/DNA sowie eine Hemmung der Histonsynthese. Ihrer Ansicht nach geht der Wandel in der Struktur des Chromatins der Änderung der DNA-Synthese und dem nachfolgenden Zelltod voraus. Diesen Mechanismus halten auch Horáková und Mitarbeiter als Erklärung ihrer Ergebnisse für möglich.

Die kurzfristige Behandlung mit HU kann die Häufigkeit gegen Methotrexat-resistenter Zellkolonien erhöhen. Die Zellen besitzen dabei ein amplifiziertes Gen für die Dehydrofolatreduktase. Als Ursache wird angenommen, daß es unter HU zu einer disproportionalen DNA Replikation kommt (Lit. bei Barsoum und Varshavsky, 1983).

Der genaue Mechanismus, der zum Auftreten der mehrkernigen Zellen führt, ist jedoch ungeklärt.

4. GESAMTDISKUSSION

In dieser Arbeit wird das Volumen (mit Hilfe des Coulter Prinzips) und die RNA-Synthese (mit Hilfe autoradiographischer Methoden) von L-929 Zellen beim 'unbalanced growth' ermittelt.

Während die Volumenbestimmung eine recht genaue qualitative Beschreibung zuläßt, sind mit der Autoradiographie in diesem Fall nur quantitative Angaben möglich.

Der Vorteil der Autoradiographie liegt darin, daß sie es ermöglicht, Stoffwechseluntersuchungen in zellulären und subzellulären Bereichen durchzuführen, und zwar unter Berücksichtigung der Zellstruktur (Schultze, 1968).

Unmittelbar nach Zugabe einer Vielzahl von Chemotherapeutika beginnt die Zunahme des Zellvolumens in einer Größenordnung zwischen 1 und 10 % der Zellmasse pro Stunde.

Dies ist bei Zellkulturen in vitro, in menschlichen Leukozyten und an tierischen Tumorsystemen beschrieben worden (Ross, 1981).

Systematische Untersuchungen über die Auswirkung der HU-Dosis auf das 'unbalanced growth' wurden bisher nicht durchgeführt.

Bei den L-929 Zellen erfolgt die Volumenzunahme nur in einem sehr schmalen Dosisbereich. Bei Konzentrationen von 2 mM und mehr überwiegt der toxische Effekt. Konzentrationen kleiner als 0,5 mM zeigen keine Wirkung.

Die Zunahme des Volumens erfolgt nur bis zu einem gewissen Maximum. In den eigenen Untersuchungen liegt dies im Bereich des 2,4fachen Ausgangsvolumens.

Der maximale Volumenzuwachs scheint zellspezifisch zu sein. Sinclair beschreibt 1967 an V-79 Fibroblasten eine Steigerung auf den 3- bis 4fachen Wert.

Frankfurt (1982) stellt fest, daß der RNA-Gehalt einer Zelle bei HU-Dauergabe nur bis zu einem maximalen Wert ansteigen kann.

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß L-929 Zellen die Fähigkeit haben, eine gewisse Zeit den Zustand des 'unbalanced growth' zu überstehen. Nähert sich die Dauer der HU-Exposition der Zellzykluslänge, so nimmt die Lebensfähigkeit der Zelle ab. Auch andere Untersucher finden zunehmenden Zelltod nach einer HU-Exposition, die sich der Zellzyklusdauer nähert (Sinclair, 1967, Bacchetti und Whitmore, 1969, Rosenberg und Gregg, 1969, Coyle und Strauß, 1970, Wheeler et al., 1972, Cress und Gerner, 1977, Frankfurt, 1981).

Offenbar verfügt die Zelle über eine gewisse Reservekapazität zur Hypertrophie, die im Normalzustand nicht ausgenutzt wird.

Durch die HU-Wirkung (Hemmung der DNA-Synthese) erfolgt eine Stimulierung, dabei verläuft die RNA-Synthese gleichsinnig mit der Volumenzunahme. Der Transport der RNA vom Nukleolus/Kern zum Cytoplasma bleibt unverändert. Dieser "physiologische" Zustand hält jedoch nicht unbegrenzt an.

Eine Reihe von Hypothesen versucht zu erklären, warum 'unbalanced growth' letztlich zum Zelltod führt.

Einige Untersucher sehen als Ursache die direkte Einwirkung des HU auf die DNA oder die Induktion einer pathologischen DNA-Synthese.

Sie stützen ihre Ergebnisse durch folgende Beobachtungen während der HU-Exposition: Strangbrüche der DNA und Neusynthese abnorm kleiner DNA (Coyle und Strauß, 1970), Chromosomenaberrationen (Oppenheim und Fishbein, 1965, Yu und Sinclair, 1968), abnorme Mitosen (Sinclair, 1967) sowie periphere Verteilung neusynthetisierter DNA innerhalb des Kerns (Ockey und Allen, 1975).

Ramseier und Mitarbeiter (1977) interpretieren diese Ergebnisse als sekundäre Effekte, bedingt durch die Hemmung der DNA-Replikation.

Sitte (1975) beschreibt das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen als limitierenden Faktor der Größen- (Volumen-) zunahme einer Zelle. Dies gilt auch für den Zellkern. Durch die spezifischen Transportstellen in der Kernmembran ("Kernporen") findet der Austausch vieler Makromoleküle zwischen Kern und Cytoplasma statt. Die 'Porendichte' (Porenzahl pro Kernoberfläche) ist bei kleinen Kernen gering, bei großen Kernen hoch.

Bei der Volumenzunahme wächst die Oberfläche mit der zweiten Potenz, das Volumen aber mit der dritten Potenz des Kerndurchmessers. Der Oberflächen/Volumen-Quotient wird immer kleiner, und es wäre vorstellbar, daß von einem bestimmten Wert ab die Porendichte nicht mehr ausreicht, um die Anforderungen der Zelle zu kompensieren.

In welchem Maße die Anhäufung von Substanzen, die bei Überschreiten einer kritischen Konzentration Zelltod verursachen, chemische und physikalische Veränderungen essentieller Zellbestandteile oder zusätzliche Mechanismen ursächlich am Zelltod beim 'unbalanced growth' beteiligt sind, ist noch nicht entschieden.

Bisher ist auch noch nicht geklärt, ob das 'unbalanced growth' per se die Ursache für den Zelltod ist.

Weiterhin bleibt die Frage offen, ob das Phänomen das Ergebnis eines gestörten Zellstoffwechsels ist oder nur ein gemeinsamer Endweg, in dem die meisten Chemotherapeutika Tumorzellen töten.

Im allgemeinen wird die G_1 -Phase als das Kompartiment des Zellzyklus betrachtet, in dem die wichtigsten regulatorischen Ereignisse des Zellwachstums stattfinden (Baserga, 1976, Pardee et al., 1978).

Dies dient als Grundlage für zwei Hypothesen, die versuchen, die Kontrolle des Zellzyklus zu beschreiben. In ihrem "Transition Probability"-Modell unterteilen Smith und Martin (1973) den Zellzyklus in ein A-Stadium und in eine B-Phase.

Die B-Phase beinhaltet S, G_2 , M und einen Teil von G_1 . Einige Zeit nach der Mitose gelangen die Zellen in das A-Stadium, in dem sie nicht auf die Mitose zulaufen. In diesem Stadium können die Zellen beliebig lange verweilen. Die Wahrscheinlichkeit der Zellen in die B-Phase zu gelangen, ist dabei konstant.

Diese "Transition Probability" scheint für den Zelltyp charakteristisch zu sein, kann aber durch äußere Einflüsse verändert werden.

Die Wachstumsrate von Zellpopulationen wird bestimmt von der Wahrscheinlichkeit, mit der die Zellen das A-Stadium verlassen, von der Länge der B-Phase und der Zellverlust-rate.

In seinem "Restriction-Point"-Modell beschreibt Pardee (1974), daß durch verschiedene Kulturbedingungen Zellen in die G_0 -Phase des Zellzyklus gelangen können. Werden die äußeren Bedingungen normalisiert, so kehren sie am gleichen Punkt nach G_1 zurück. Pardee schlägt den Ausdruck "Restriction Point" für den Zeitpunkt im Zellzyklus vor, in dem der kritische Übergang von G_0 nach G_1 stattfindet. Durch Verlust der Kontrolle des "Restriction-Point" (bei malignen Zellen, nach Gabe von Chemotherapeutika) können Zellen nicht in die G_0 -Phase treten und werden an anderen Stellen des Zellzyklus, an denen sie nicht überleben, aufgehalten. Bei HU ist dies an der G_1 /S Grenze der Fall.

"Größenmodelle", die die Passage durch den Zellzyklus in Abhängigkeit von der Zellgröße beschreiben (Fantes et al.,

1975, Johnston et al., 1977) genügen wohl nicht, um die Regulation des Zellzyklus zu erklären.

Shields und Mitarbeiter (1978) zeigen an Mäusefibroblasten, daß der Hauptfaktor zur Kontrolle der Zellteilung die "Transition Probability" ist. Die Zellgröße spielt eine geringere Rolle.

In allen Modellen werden Hypothesen aufgestellt, die zeigen sollen, daß es letztlich zur Initiation der DNA-Synthese in G_1 kommt. HU führt möglicherweise zur Entkoppelung (Hemmung?) dieses Vorgangs durch Inhibition der DNA-Synthese und somit zu einer protrahierten Volumenzunahme und Erhöhung der RNA-Synthese pro Zelle.

Beim 'unbalanced growth' als zellzyklus-bezogene "Hypertrophie" bleibt die funktionelle Belastung der Zelle unverändert. Das Zellvolumen kann als direkte Funktion der Position im Zellzyklus angesehen werden. Es liegt keine funktionell induzierte Zellhypertrophie vor, wie sie durch gesteigerte Beanspruchung (Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur) oder Stimulation des Stoffwechsels (Leber nach Gabe von Phenobarbital) erreicht werden kann. Im Gegensatz zum HU-induzierten 'unbalanced growth' ist die DNA-Synthese während der funktionellen Hypertrophie nicht gehemmt. Eine reine Hypertrophie zeigt sich aber nur an Zellen, die die Fähigkeit zur Mitose verloren haben (Herz-, Skelettmuskulatur). Meist ist die Folge der funktionellen Belastung Hypertrophie und Hyperplasie (zahlenmäßige Vermehrung der Einzelzellen).

Um die komplexen Vorgänge während des 'unbalanced growth' besser darstellen zu können, müssen möglichst viele Parameter erfaßt werden.

Als eine Möglichkeit bietet sich die simultane Messung mehrerer Parameter (wie DNA, RNA, Proteine und Volumen) einer Einzelzelle an. Die Grundlage dafür bildet die Flußcytometrie.

Diese Methode ist sicher ein guter Ansatz, um das Phänomen des 'unbalanced growth' näher zu untersuchen.

Allerdings läßt sich ein genaues Bild nur durch die Kombination vieler Verfahren aufzeigen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß beim 'unbalanced growth' Größen- (Volumen-) zunahme und DNA-Replikation nicht nur auf zellulärer Ebene voneinander getrennt sind, sondern daß dies auch für die molekulare Ebene zutreffen könnte (Baserga, 1981).

5. ZUSAMMENFASSUNG

An L-929 Zellen wurde mit Hydroxyharnstoff (HU), einem spezifischen und reversiblen Inhibitor der DNA-Synthese, der Zustand des 'Unbalanced Growth' (Cohen und Barner, 1954) induziert.

Zeit- und dosisabhängige Volumenbestimmungen mit Hilfe des Coulter-Prinzips während und nach HU-Dauerexposition wurden durch autoradiographische Untersuchungen der RNA-Syntheseaktivität und des RNA-Transports in das Cytoplasma nach ^3H -Cytidin-Markierung ergänzt.

'Unbalanced growth' ergibt sich in dem Dosisbereich zwischen 0,5 und 1,0 mM HU. Unterhalb dieser Konzentration zeigt sich keine Wirkung, bei höheren Konzentrationen überwiegen toxische Effekte.

Während der HU-Zugabe steigt das Zellvolumen maximal auf das 2,4fache des Ausgangswertes.

Nach HU-Exposition bis ungefähr zur Dauer eines Zellzyklus (25 Stunden) ist der Übergang zum 'balanced growth' möglich. Dabei reduziert sich in zwei Zellteilungen nach Aufheben des Blocks schrittweise das Volumen der synchronisierten Zellen bis zum Ausgangswert.

Die RNA-Synthese läuft der Zunahme der Zellgröße parallel: Während des 'unbalanced growth' sind die Zellen in der Lage, ihre Syntheseleistungen zu erhöhen.

Der Transport der RNA vom Nukleolus/Kern zum Cytoplasma bleibt unverändert.

Die Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß auch Fibroblasten über eine Reservekapazität zur Hypertrophie verfügen, die unter normalen Bedingungen nicht ausgenutzt wird, da bei Erreichen einer möglicherweise kritischen Zellgröße in der späten G₁-Phase eine Initiation der DNA-Synthese erfolgt. Entkoppelung dieses Vorgangs durch Inhibition der DNA-Synthese führt zu einer protrahierten Volumenzunahme und Erhöhung der RNA-Synthese pro Zelle.

Dieses 'unbalanced growth' kann nicht mit der funktionell induzierten Hypertrophie gleichgesetzt werden, da die Volumenzunahme ohne Änderung der funktionellen Belastung zellzyklusabhängig erfolgt und nach Aufheben des DNA-Syntheseblocks rückläufig ist.

Das hier beschriebene System eignet sich als Modell für quantitative Untersuchungen über die Variationsbreite und Modifizierbarkeit zellulärer Konstanten bei normalem Wachstum und möglicher Abweichungen nach der malignen Transformation.

6. TABELLARISCHER ANHANG

In den Tabellen 1 - 6 sind die Werte der Volumenverteilung der L-929 Zellen aufgeführt. Mode, Median, Interdezilbereiche und Schiefe wurden aus den Coulter-Kurven berechnet, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben.

Die Daten in μm^3 sind Mittelwerte aus 3 - 5 Versuchen.

Für die Schiefe gilt:

- > 1: rechtssteile Verteilung
- < 1: linkssteile Verteilung
- = 1: symmetrische Verteilung
- 2: zweigipfelter Kurvenverlauf

Tab. 1: Volumenverteilung unbehandelter L-929 Zellen

hr nach Sub- kultivierung	mode	median	Interdezil		Schiefe
			10 %	90 %	
20	2600	2790	--	--	< 1
25	1950	2570	1510	3900	< 1
30	1770	2300	1510	3800	< 1
35	1860	2260	1330	3680	< 1
40	1770	2040	1240	3370	< 1
45	1680	1990	1240	3370	< 1
50	1550	1860	890	3370	< 1
50	1330	1730	890	3100	< 1
80	1240	1590	890	3010	< 1
95	1240	1420	800	2750	< 1
120	1060	1330	710	2750	< 1

Werte in μm^3

Legende vgl. Seite 74

Tab. 2: Volumenverteilung bei Dauerexposition mit 1 mM HU

hr HU- Exposition	mode	median	Interdezil		Schiefe
			10 %	90 %	
5	1860	2390	1510	3630	< 1
10	2210	2660	1770	4160	< 1
20	3270	3500	2130	5050	< 1
25	3630	3900	2390	5760	< 1
30	4610	4150	2300	5930	< 1
35	4650	4300	2390	6020	1
40	4960	4610	2570	6640	1
50	5140	4910	2750	6820	> 1
60	5310	5310	2830	7530	> 1
75	--	5760	3010	8060	> 1
100	--	--	--	--	--

Werte in μm^3

Legende vgl. Seite 74

Tab. 3: Volumenverteilung bei Dauerexposition mit 10,0 mM HU

hr HU Exposition	mode	median	Interdezil		Schiefe
			10 %	90 %	
5	1770	2040	1420	3190	< 1
10	2170	2210	1510	3190	< 1
25	2660	2480	1510	3720	< 1
30	2660	2480	1510	3720	< 1
40	2210	2480	1680	3720	< 1
50	2480	2480	1680	3630	< 1
60	2350	2480	--	3810	--
75	--	--	--	--	--

Werte in μm^3

Legende vgl. Seite 74

Tab. 4: Volumenverteilung bei Dauerexposition mit 0.5 mM HU

hr HU- Exposition	mode	median	Interdezil		Schiefe
			10 %	90 %	
6	2040	2480	1510	3900	< 1
8	2210	2660	1680	4250	< 1
10	2300	2790	1860	4430	< 1
14	2590	3010	1950	4610	< 1
16	2750	3190	2040	4960	< 1
18	2940	3320	2130	5050	< 1
20	3190	3450	2210	5140	< 1
22	3410	3590	2300	5310	< 1
24	3450	3680	2300	5400	< 1
26	3540	3630	2210	5310	< 1
28	3680	3720	2210	5490	< 1
30	3540	3590	2040	5230	< 1
33	3540	3760	2040	5580	1
40	3740	3720	1680	5760	1

Werte in μm^3

Legende vgl. Seite 74

Tab. 5: Volumenverteilung bei Dauerexposition mit 0.1 mM HU

hr HU- Exposition	mode	median	Interdezil		Schiefe
			10 %	90 %	
5	1990	2350	1510	3720	< 1
10	2040	2440	1600	3940	< 1
25	2610	2880	1770	4430	< 1
30	2390	2750	1680	4430	< 1
35	2040	2660	1680	4340	< 1
40	1950	2480	1460	4210	< 1
50	1990	2480	1420	3990	< 1
75	1550	2040	1150	3720	< 1
100	1510	2040	1240	3810	< 1

Werte in μm^3

Legende vgl. Seite 74

Tab. 6: Volumenverteilung nach Aufheben eines 24stündigen
HU-Blocks (0,5 mM)

hr nach Ende des HU-Blocks	mode	median	Interdezil		Schiefe
			10 %	90 %	
0	3500	3630	2080	5230	< 1
2	3630	3720	2130	5540	< 1
4	3760	3630	1590	5490	< 1
5	3760	3760	1950	5360	< 1
6	4070	3850	1860	5670	< 1
7	3880	3630	1640	5450	< 1
8	4070	3410	1460	5490	< 1
9	1770	2790	1330	5090	2
10	1820	2390	1240	5000	2
11	1860	2210	1150	4870	2
14	1930	2260	1150	4340	< 1
15	2300	2480	1240	4690	< 1
16	2520	2520	1330	4610	< 1
17	2280	2440	1240	4340	< 1
18	2520	2440	1200	4120	< 1
19	2700	2480	1150	4470	< 1
20	2520	2440	1150	4250	< 1
21	1500	2480	1110	4470	2
22	1950	2390	1060	4300	2
23	1560	2300	1110	4470	2
24	1510	2170	1060	4380	< 1
25	1680	1990	1020	4120	< 1
26	1550	1990	1020	4070	< 1
28	1640	1900	970	3990	< 1
30	1720	1950	1060	3940	< 1
40	1640	1950	970	3990	< 1

Werte in μm^3 ; Legende vgl. Seite 74

Tab. 7: Bestimmung der Osmolarität des Mediums mit Hilfe eines Digital-Osmometers (Knauer, Bad Homburg)

TCM 199 + 10 % KS	313	$\bar{x} = 314 \text{ mOsmol/kg}$
	314	
	311	
	318	
TCM 199 + 10 % KS + 0,1 mM HU	317	$\bar{x} = 315,5 \text{ mOsmol/kg}$
	312	
	319	
	314	
TCM 199 + 10 % KS + 0,5 mM HU	319	$\bar{x} = 318 \text{ mOsmol/kg}$
	317	
	318	
TCM 199 + 10 % KS + 1,0 mM HU	314	$\bar{x} = 316,3 \text{ mOsmol/kg}$
	316	
	319	
TCM 199 + 10 % KS + 10 mM HU	326	$\bar{x} = 327 \text{ mOsmol/kg}$
	326	
	329	

Tab. 8: Silberkornzahl (SKZ) über Nukleolus (N), Kern (K) und Cytoplasma (C) von L-929 Zellen bei HU-Dauerexposition (0.5 mM).

Für 5 min. erfolgte eine Pulsmarkierung des Mediums mit ^3H -Cytidin (3 $\mu\text{Ci/ml}$). Danach wurden die Zellen in kurzen Intervallen fixiert und aus diesen Präparaten bei 100 Zellen die Silberkornzahl (Mittelwert $\pm$ SD) getrennt über Nukleolus, Kern und Cytoplasma bestimmt.

		Zeit in min. nach Pulsmarkierung						
		1'	4'	9'	15'	25'		
0	N	5,27 $\pm$ 2,16	7,33 $\pm$ 3,36	6,39 $\pm$ 2,57	5,60 $\pm$ 2,89	5,94 $\pm$ 2,81		
	K	7,24 $\pm$ 2,60	12,68 $\pm$ 4,48	15,26 $\pm$ 4,90	17,91 $\pm$ 5,72	21,87 $\pm$ 7,04		
	C	0	0	0	0	1,95 $\pm$ 2,48		
2	N	3,45 $\pm$ 2,00	4,34 $\pm$ 2,17	5,16 $\pm$ 2,75	5,14 $\pm$ 2,93	6,08 $\pm$ 3,08		
	K	4,47 $\pm$ 2,30	8,66 $\pm$ 3,72	25,31 $\pm$ 8,74	18,58 $\pm$ 5,38	19,64 $\pm$ 5,53		
	C	0	0	0	0,58 $\pm$ 0,99	3,33 $\pm$ 2,67		
5	N	3,73 $\pm$ 2,12	5,87 $\pm$ 2,55	6,52 $\pm$ 3,14	6,13 $\pm$ 2,74	7,26 $\pm$ 2,93		
	K	7,77 $\pm$ 3,35	18,48 $\pm$ 6,49	25,45 $\pm$ 7,86	24,44 $\pm$ 7,32	26,93 $\pm$ 9,09		
	C	0	0	0	0,51 $\pm$ 0,88	6,61 $\pm$ 4,15		
10	N	4,51 $\pm$ 2,28	6,16 $\pm$ 3,15	7,37 $\pm$ 3,04	9,01 $\pm$ 3,80	10,12 $\pm$ 3,52		
	K	14,46 $\pm$ 5,17	22,84 $\pm$ 7,70	28,07 $\pm$ 9,58	34,27 $\pm$ 10,14	30,74 $\pm$ 8,77		
	C	0	0	0	1,07 $\pm$ 1,27	5,24 $\pm$ 2,78		
20	N	5,75 $\pm$ 2,65	7,45 $\pm$ 2,78	9,82 $\pm$ 3,76	10,19 $\pm$ 3,55	12,38 $\pm$ 4,24		
	K	14,72 $\pm$ 6,17	22,31 $\pm$ 6,35	30,60 $\pm$ 9,80	36,77 $\pm$ 11,07	42,53 $\pm$ 11,68		
	C	0	0	0	1,08 $\pm$ 1,09	2,86 $\pm$ 1,94		

Zeit in min. nach Pulsmarkierung

		Zeit in min. nach Pulsmarkierung									
		40'					60'				
		80'					100'				
		120'									
0	N	5,95 +	3,15	4,90 +	2,37	4,31 +	2,25	4,14 +	2,60	3,48 +	2,18
	K	22,46 +	6,26	21,57 +	8,08	22,91 +	7,53	24,30 +	9,25	21,22 +	6,63
	C	3,43 +	3,14	11,66 +	6,78	13,30 +	9,61	36,09 +	12,22	35,49 +	11,84
2	N	6,38 +	3,08	7,19 +	3,13	4,41 +	2,05	5,86 +	2,73	5,54 +	2,81
	K	24,60 +	6,61	27,77 +	6,89	18,48 +	5,44	25,72 +	7,20	22,92 +	7,62
	C	14,12 +	5,97	32,70 +	10,13	31,48 +	9,99	54,34 +	16,76	54,96 +	19,18
5	N	8,86 +	3,47	7,64 +	2,67	7,63 +	3,62	6,97 +	2,71	6,78 +	2,91
	K	30,06 +	9,00	26,11 +	8,06	28,64 +	9,17	25,29 +	6,58	24,68 +	7,51
	C	23,77 +	9,55	37,51 +	12,61	53,85 +	24,62	53,43 +	18,26	58,20 +	19,92
10	N	8,53 +	3,61	9,77 +	3,45	9,45 +	3,72	9,81 +	3,70	8,50 +	3,45
	K	28,13 +	8,43	29,19 +	8,37	29,30 +	9,19	28,33 +	8,98	27,21 +	7,82
	C	17,17 +	6,94	30,55 +	9,81	39,94 +	13,04	51,65 +	19,37	58,91 +	16,69
20	N	12,78 +	4,24	11,10 +	4,13	10,50 +	3,72	12,98 +	4,27	9,89 +	3,83
	K	41,10 +	11,43	36,54 +	10,78	31,65 +	9,38	39,71 +	9,54	33,24 +	8,28
	C	13,11 +	5,87	27,87 +	10,86	36,15 +	14,23	51,57 +	16,77	64,43 +	21,16

hr HU-Exposition

Tab. 9: Silberkornzahl (SKZ) über Nukleolus (N), Kern (K) und Cytoplasma (C) von L-929 Zellen, 9 bzw. 14 Stunden nach Aufheben eines 24stündigen HU-Blocks (0,5 mM).

Für 5 min. erfolgte eine Pulsmarkierung des Mediums mit ³H-Cytidin (3 µCi/ml). Danach wurden die Zellen in kurzen Intervallen fixiert und aus diesen Präparaten bei 100 Zellen die Silberkornzahl (Mittelwert ± SD) getrennt über Nukleolus, Kern und Cytoplasma bestimmt.

		Zeit in min. nach Pulsmarkierung				
		1'	4'	9'	15'	25'
9	N	3,91 ±	6,44 ±	6,27 ±	7,05 ±	7,38 ±
	K	11,75 ±	18,58 ±	21,63 ±	21,83 ±	22,58 ±
	C	--	--	0,44 ±	1,43 ±	2,11 ±
14	N	4,12 ±	6,51 ±	6,58 ±	6,35 ±	6,73 ±
	K	11,38 ±	16,62 ±	22,67 ±	20,67 ±	23,90 ±
	C	--	--	0,63 ±	1,21 ±	2,13 ±

hr HU-Exposition

		Zeit in min. nach Pulsmarkierung				
		40'	60'	80'	100'	120'
9	N	8,41 ±	7,32 ±	7,34 ±	6,35 ±	--
	K	24,86 ±	22,82 ±	21,10 ±	18,13 ±	--
	C	14,43 ±	23,41 ±	33,53 ±	34,61 ±	--
14	N	7,67 ±	8,05 ±	7,19 ±	8,10 ±	8,73 ±
	K	25,36 ±	24,71 ±	25,98 ±	23,71 ±	24,46 ±
	C	7,12 ±	20,64 ±	34,77 ±	35,92 ±	41,05 ±

hr HU-Exposition

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, R.L.P., BERRYMAN, S., and THOMSON, A.: Deoxyribonucleoside triphosphate pools in synchronised and drug-inhibited L929 cells.
Biochem. et Biophys. Acta 240: 455-462, 1971
- ADAMS, R.L.P., and LINDSAY, J.G.: Hydroxyurea, reversal of inhibition and use as a synchronizing agent.
J. Biol. Chem. 242: 1314-1317, 1967
- ADAMSON, R.H., AGUE, S.L., HESS, S.M., and DAVIDSON, J.D.: The distribution, excretion and metabolism of hydroxyurea-¹⁴C.
J. Pharmacol. exp. Ther. 150: 322, 1965
- AITCHISON, J., and BROWN, J.A.C.: The lognormal distribution.
Cambridge University Press, 1957
- ANDERSON, E.C., BELL, G.J., PETERSEN, D.F., and TOBEY, R.A.: Cell growth and division. IV. Determination of volume growth rate and division probability.
J. Biophys. 9: 246-263, 1969
- ANDERSON, E.C., PETERSEN, D.F., and TOBEY, R.A.: Biochemical balance and synchronized cell cultures.
Nature 215: 1083-1084, 1967
- ANTONI, F., KÖTELES, G.J., HEMPEL, K., MAURER, W.: Über die Eignung verschiedener Fixationen und perchlorsäurehaltiger Lösungen für autoradiographische Untersuchungen des RNS-, DNS- und Proteinstoffwechsels.
Histochemie 5: 210-220, 1965
- BACCHETTI, S., and WHITMORE, G.F.: The action of hydroxyurea on mouse L-cells.
Cell Tissue Kinet. 2: 193-211, 1969
- BARSOUM, J., and VARSHAVSKY, A.: Mitogenic hormones and tumor promoters greatly increase the incidence of colony-forming cells bearing amplified dihydrofolate reductase genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5330-5334, 1983
- BASERGA, R.: Multiplication and division in mammalian cells. *Biochemistry of disease. A series of monographs*, Vol. 6
Marcel Dekker, New York, 1976
- BASERGA, R.: The Cell Cycle
New Engl. J. Med. 304: 453-459, 1981

- BASERGA, R., and MALAMUD, D.: RNA Synthesis.
in: Modern Methods in Exptl. Pathology
Autoradiography. Techniques and Application
Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers, 1969
- BELL, G.J., and ANDERSON, E.C.: Cell Growth and Division.
I. A mathematical model with applications to cell volume
distributions in mammalian suspension cultures.
II. Experimental studies of cell volume distribution in
mammalian suspension cultures.
J. Biophys. 7: 329-364, 1967
- BHUYAN, B.K., FRASER, T.J., GRAY, L.G., KUENTZEL, S.L., and
NEIL, G.L.: Cell-kill kinetics of several S-phase-specific
drugs.
Cancer Res. 33: 888-894, 1973
- BLOMQUIST, C.H., GREGG, C.T., and TOBEY, R.A.: Enzyme and
coenzyme levels, oxygen uptake and lactate production in
synchronized cultures of Chinese hamster cells.
Exp. Cell Res. 66: 75- , 1971
- BONO, V.H., and WELLS, J.H.: Inhibition of ribonucleotide
reductase by hydroxyurea.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 9: 7-18, 1968
- BRECHER, G., JAKOBKE, E.F., SCHNEIDERMAN, M.A., WILLIAMS,
G.Z., and SCHMIDT, P.J.: Size distribution of erythrocytes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 99: 242-251, 1962
- COHEN, L.S., STUDZINSKI, G.P.: Correlation between cell
enlargement and nuclear acid and protein content of HeLa
cells in unbalanced growth produced by inhibitors of DNA
synthesis.
J. Cell. Physiol. 69: 331-339, 1967
- COHEN, S.S., and BARNER, H.D.: Studies on unbalanced growth
in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. 40: 885-8933, 1954
- COLVIN, M., and BONO, V.H.: The enzymatic reduction of
hydroxyurea to urea by mouse liver.
Cancer Res. 30: 1516-1519, 1970
- COYLE, M.B., and STRAUSS, B.: Cell killing and the accumulation
of breaks in the DNA of HEP-2 cells incubated in the
presence of hydroxyurea.
Cancer Res. 30: 2314-2319, 1970
- CRESS, A.E., and GERNER, E.W.: Hydroxyurea treatment affects
the G1 phase in next generation CHO cells.
Exp. Cell Res. 100: 347-353, 1977

- CURTIS, G.L., ELLIOT, J.A., WILSON, R.B., and RYAN, W.L.:
Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and cell volume.
Cancer Res. 33: 3273-3276, 1973
- FABRICIUS, E. and RAJEWSKY, M.F.: Determination of hydroxy-
urea in mammalian tissues and blood.
Revue Européenne d'Etudes Clin. Biol. 16: 679-683, 1971
- FANTES, P.A., GRANT, W.D., PRITCHARD, R.H., SUDBERY, P.E.,
and WHEALS, A.E.: The regulation of cell size and the
control of mitosis.
J. Theoret. Biol. 50: 213-244, 1975
- FARBER, E., and BASERGA, R.: Differential effects of
hydroxyurea on survival of proliferating cells in vivo.
Cancer Res. 29: 136-139, 1969
- FORD, S.S., and SHACKNEY, S.E.: Lethal and sublethal effects
of hydroxyurea in relation to drug concentration and
duration of drug exposure in sarcoma 180 in vitro.
Cancer Res. 37: 2628-2637, 1977
- FRANKFURT, O.S.: Unbalanced growth and cell death in HeLa S3
cultures treated with DNA synthesis inhibitors.
J. Cell Physiol. 107: 115-122, 1981
- FRANKFURT, O.S.: Unbalanced growth and kinetics of ds RNA
accumulation in HeLa S3 cells treated with DNA synthesis
inhibitors.
Cell Tissue Kinet. 15: 102, 1982
- GREGG, E.C., and STEIDLEY, K.D.: Electrical counting and
sizing of mammalian cells in suspension.
J. Biophys. 5: 393-414, 1965
- GRÜNEISEN, A., RAJEWSKY, M.F., REMMER, J., and USCHKOREIT, J.:
Inhibition of 3H-Thymidine incorporation by hydroxyurea:
Atypical response of mycoplasma-infected cells in culture.
Exp. Cell Res. 90: 365-373, 1975
- HANSEN, G.: Methodenlehre der Statistik.
Verlag Franz Vahlen, München, 1974
- HARRIS, M.: Growth measurements on monolayer cultures with an
electronic cell counter.
Cancer Res. 19: 1020-1024, 1959
- HAYFLICK, L.: Subculturing human diploid fibroblast cultures.
in: Tissue Culture, Methods and Applications
Kruse, P.F., and Patterson, M.K. eds.
Academic Press, 1973

- HILL, R.B., and GORDON, J.A.: Effect of hydroxyurea analogues in regenerating rat liver.
Exptl. Mol. Pathol. 9: 71-76, 1968
- HORAKOVA, K., NAVAROVA, J., and PATERSON, A.R.P.: The delayed cytotoxic effect of 6-mercaptopurine. Characterization of the unbalanced growth in HeLa cells produced by 6-mercaptopurine.
Biochem. Biophys. Acta 366: 333-340, 1974
- INSTRUCTION MANUAL FOR COULTER COUNTER MODEL ZBI (Biological)
Second Edition, July 1973
Coulter Electronics Ltd., Coldharbour Lane, Harpenden, Hertfordshire, England
- INSTRUCTION MANUAL FOR COULTER CHANNELYZER C-1000
5th Edition, Sept. 1976
Coulter Electronics Ltd., Coldharbour Lane, Harpenden, Hertfordshire, England
- JOHNSTON, G.C., PRINGLE, J.R., and HARTWELL, L.H.: Coordination of growth with cell division in the yeast *saccharomyces cerevisiae*.
Exp. Cell Res. 105: 79-98, 1977
- KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., and CURRIE, A.R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer 26: 239-257, 1972
- KIM, J.H., GELBARD, A.S., PEREZ, A.G.: Action of hydroxyurea on the nucleic acid metabolism and viability of HeLa cells.
Cancer Res. 27: 1301-1305, 1967
- KIM, J.H., PEREZ, A.G., and DJORDJEVIC, B.: Studies on Unbalanced growth in synchronized HeLa cells.
Cancer Res. 28: 2443-2447, 1968
- KIM, J.H., KIM, S.H., and EIDINOFF, M.L.: Cell Viability and nucleic acid metabolism after exposure of HeLa cells to excess thymidine and deoxyadenosine.
Biochem. Pharmacol. 14: 1821-1829, 1965
- KITCHING, G.R., and FOURNIER, M.J.: Unbalanced growth and production of unique transfer ribonucleic-acids in relaxed-control *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 124: 1382-1394, 1975
- KLEIN, G., FORSSBERG, A.: Studies on the effect of X-rays on the biochemistry and cellular composition of ascites tumors. I. Effect on growth rate, cell volume, nucleic acid and mitogen content in the Ehrlich ascites tumor.
Exp. Cell Res. 6: 211-220, 1954

- KRAKOFF, J.H.N., BROWN, N.C., and REICHARD, P.: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. Cancer Res. 28: 1559-1565, 1968
- KREYZIG, E.: Statistische Methoden und ihre Anwendungen. 6. Auflage Vandenhoecck & Ruprecht, Göttingen, 1977
- KUCHLER, R.J., and MERCHANT, D.J.: Growth of tissue cells in suspension. Univ. Mich. Med. Bull. 24: 200-212, 1958
- KUCHLER, R.J., and MERCHANT, D.J.: Propagation of strain L (Earle) cells in agitated fluid suspension cultures. Soc. Exp. Biol. Med. 92: 803-812, 1956
- LAMB, J.F.: The Coulter Counter and the C-1000 Channelyzer in tissue culture. Presented at the Coulter Conference, London, April 12th, 1973
- LAMBERT, W.C., and STUDZINSKI, G.P.: Recovery from prolonged unbalanced growth induced in HeLa cells by high concentrations of thymidine. Cancer Res. 27: 2364-2369, 1967
- MAURER-SCHULTZE, B.: Various autoradiographic methods as a tool in cell growth studies. from: Cell Growth Claudio Nicolini Plenum Public Corporation, S. 83-111, 1982
- MICKLEM, K.J., and PASTERNAK, C.A.: The use of the Coulter Counter to measure the volume of cultured cells. Presented at the Coulter Conference, London, April 15th, 1975
- MOHLER, W.C.: Cytotoxicity of hydroxyurea reversible by pyrimidine deoxyribosides in a mammalian cell line grown in vitro. Cancer Chemotherapy Rept. 34: 1-6, 1964
- MOORE, E.C.: Inhibition of partially purified ribonucleotide reductase by hydroxyurea. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 9: 51, 1968
- MORGAN, J.F., MORTON, H.J., and PARKER, R.C.: Nutrition of animal cells in tissue culture. Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 73: 1-20, 1950

- NIAS, A.H.W., and FOX, M.: Synchronisation of mammalian cells with respect of the mitotic cycle.
Cell Tissue Kinet. 4: 375-398, 1971
- OCKEY, C.H., and ALLEN, T.D.: Distribution of DNA or DNA synthesis in mammalian cells following inhibition with hydroxyurea and 5-fluorodeoxyuridine.
Exp. Cell Res. 93: 275-282, 1975
- OPPENHEIM, J.J., and FISHBEIN, W.N.: Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxyurea and related compounds.
Cancer Res. 25: 980-985, 1965
- PAINTER, R.B., and DREW, R.M.: Studies on deoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell structures (HeLa).
Lab. Invest. 8: 278-285, 1959
- PARDEE, A.B.: A restriction point for control of normal animal cell proliferation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1268-1290, 1974
- PFEIFFER, S.E., and TOLMACH, L.J.: Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxyurea.
Cancer Res. 27: 124-129, 1967
- PHILIPS, F.S., STERNBERG, S.S., SCHWARTZ, H.S., CRONIN, A.P., SODERGREN, J.E., and VIDAL P.M.: Hydroxyurea. I. Acute cell death in proliferating tissues in rats.
Cancer Res. 27: 61-74, 1967
- PHILLIPS, H.J.: Dye exclusion tests for cell viability.
in: Tissue Culture, Methods and Applications
Kruse, P.F., and Patterson, M.K., eds.
Academic Press, 1973
- PLAGEMANN, P.G.W., and ERBE, J.: Intracellular conversion of deoxyribonucleosides by Novikoff rat hepatoma cells and effects of hydroxyurea.
J. Cell Physiol. 83: 321-336, 1974
- POLLAK, R.D., and ROSENKRANZ, H.S.: Metabolic effects of hydroxyurea on BHK 21 cells transformed with polyoma virus.
Cancer Res. 27: 1214-1224, 1967
- RABES, H.M., ISELER, G., TUCZEK, H.V., and KERLER, R.: Increased synchrony of DNA-synthesis in regenerating rat liver after continuous infusion of hydroxyurea.
Experientia 30: 1116-1117, 1974

- RABES, H.M., ISELER, G., CZICHOS, S., and TUCZEK, H.V.: Synchronization of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea
Cancer Res. 37: 1105-1111, 1977
- RAJEWSKY, M.F., HÜLSER, D.F., and FABRICIUS, E.: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen.
Z. Krebsforschung 76: 266-292, 1971
- RAMSEIER, H.P., Burkhalter, M., and GAUTSCHI, J.R.: Survival of CHO cells that replicated DNA in the presence of hydroxyurea.
Exp. Cell Res. 105: 445-453, 1977
- REED, R.D., HUGHES, T.J., TAYLOR, W-B., and BRUCE, W.R.: The electronic determination of the size distribution of L-cell minicolonies.
Exp. Cell Res. 56, 435-442, 1969
- RICHES, P.G., and HARRAP, K.R.: Somme effects of chlorambucil on the chromation of Yoshida ascites sarcoma cells.
Cancer Res. 33: 389-393, 1973
- RØNNING, Ø. W., and SEGLEN, P.O.: The relation between protein accumulation and cell cycle traverse of human NHIK 3025 cells in unbalanced growth.
J. Cell Physiol. 112: 19-26, 1982
- ROSENBERG, H.M., and GREGG, E.C.: Kinetics of cell volume changes of Murine lymphoma cells subjected to different agents in vitro.
J. Biophys. 9: 592-608, 1969
- ROSS, D.W.: Cell colume growth after cell cycle block with chemotherapeutic agents
Cell Tissue Kinet. 9: 379-387, 1976
- ROSS, D.W.: The nature of unbalanced cell growth caused by cytotoxic agents
Virchows Arch. (Cell Pathol.) 37: 225-235, 1981
- RUECKERT, R.R., MUELLER, G.C.: Studies on unbalanced growth in tissue culture
I. Induction and consequences of thymine deficiency
Cancer Res. 20: 1584-1591, 1960

- RUHENSTROTH-BAUER, G., and ZANG, D.: Automatische Zählmethoden:
Das Coulter'sche Partikelzählgerät.
Blut 6: 446-462, 1960
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden
2. Auflage, Springer Verlag, 1969
- SCHERBAUM, O., and RASH, G.: Cell size distribution and single
cell growth in tetrahymena pyriformis G.2.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 41: 161, 1957
- SCHMIDKONZ, P.: Stereologisch-morphometrische Untersuchungen
an der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-
Dauerbehandlung
Inaugural-Dissertation, München, 1979
- SCHMIDKONZ, P., HÜBNER, G., RABES, H.M.: Morphometrische Unter-
suchungen zur hepatozellulären Hypertrophie bei Hydroxaharn-
stoff-induziertem "unbalanced growth".
Verh. Dtsch. Ges. Path. 61: 473, 1977
- SCHNEIDER, G., und MAURER, W.: Autoradiographische Untersuchung
über den Einbau von H-3-Cytidin in die Kerne einiger Zell-
arten der Maus und über den Einfluß des Fixationsmittels auf
die H-3-Aktivität
Acta histochem. 15: 171-181, 1963
- SCHULTZE, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure-
und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm.
in: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. II/5
Altmann, H.W., Büchner, F., Cottier, H., Holle, G.,
Letterer, W., Masshoff, W., Meesen, H., Roulet, F.,
Seifert, G., Siebert, G., und Studer, A., eds.
Berlin, Springer, 1968
- SCHWARTZ, H.S., GAROFALO, M., STERNBERG, S.S., and PHILIPS,
F.S.: Hydroxyurea: Inhibition of deoxyribonucleic acid
synthesis in regenerating liver of rats.
Cancer Res. 25: 1867-1870, 1965
- SHIELDS, R., BROOKS, R.F., RIDDLE, P.N., CAPELLARO, D.F.,
and DELIA, D.: Cell size, cell cycle and transistion
probability in mouse fibroblasts.
Cell 15: 469-474, 1978
- SIMONS, J.W.I.M.: Characterization of somatic cells by
determination of their volumes with a Coulter Counter.
J. Cell Biol. 46: 610-612, 1970

- SINCLAIR, W.K.: Differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle.
Science: 150: 1729-1731, 1965
- SINCLAIR, W.K.: Hydroxyurea: Effects on Chinese hamster cells grown in culture.
Cancer Res. 27: 297-308, 1967
- SINCLAIR, W.K., and ROSS, D.W.: Modes of growth in mammalian cells.
J. Biophys. 9: 1056-1070, 1969
- SITTE, P.: Zelluläres und Molekulares: Biologie der Minimal-Organismen
in: Mannheimer Forum 1975/76
Studienreihe Boehringer Mannheim
- SKOOG, L., and BJURSELL, G.: Nuclear and cytoplasmic pools of deoxyribonucleoside triphosphates in Chinese hamster ovary cells.
J. Biol. Chem. 243: 6434-6438, 1974
- SMITH, J.A., and MARTIN, L.: Do cells cycle?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1263-1267, 1973
- SUZUKI, N., WITHERS, H.R., and KOEHLER, M.W.: Heterogeneity and viability of artificial lung colony-forming ability among clones from mouse fibrosarcoma.
Cancer Res. 38: 3349-3351, 1978
- TAYLOR, I.W., TATTERSALL, M.H.N., and FOX, R.M.: Flow cytofluorometric analysis of unbalanced cell growth.
Acta pathol. microbiol. Scand. Sect. A: 89: 516-521, 1981, Suppl. 2741
- THEISS, J.C., and FISCHER, G.A.: Inhibition of intracellular pyrimidine ribonucleotide reduction by deoxycytidine, arabinosylcytosine and hydroxyurea
Biochem. Pharmacol. 25: 73-79, 1976
- TOBEY, R.A., and CRISSMANN, H.A.: Preparation of large quantities of synchronised mammalian cells in late G1 in the pre-DNA replicative phase of the cellcycle.
Exp. Cell Res. 75: 460-464, 1972
- ÜBERLA, K.: Biomathematik. Erläuterungen und Lernhilfen zum Gegenstandskatalog.
Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Universität München, 1976

- VIRCHOW, Rudolf: Handbuch der Speciellen Pathologie und Therapie. 1. Band
Erlangen, Verlag Ferdinand Enke, 1854
- WALTERS, R.A., TOBEY, R.A., and RATCLIFF, R.L.: Cell-cycle-dependent variations of deoxyribonucleoside triphosphate pools in Chinese hamster cells.
Biochem. Biophys. Acta 319: 336-347, 1973
- WEBER, E.: Grundriß der Biologischen Statistik
2. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1956
- WHEELER, G.P., BOWDON, B.J., ADAMSON, D.J., and VAIL, M.H.: Comparison of the effects of several inhibitors of the synthesis of nucleic acids upon the viability and progression through the cell cycle of cultured H.Ep. No. 2 cells.
Cancer Res. 32: 2661-2669, 1972
- YARBO, J.W., KENNEDY, B.J., and BARNUM, C.P.: Hydroxyurea Inhibition of DNA synthesis in ascites tumor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53: 1033-1035, 1965
- YARBO, J.W., NIEHAUS, W.G., and BARNUM, C.P.: Effect of hydroxyurea on regenerating rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 19: 592-597, 1965
- YOUNG, C.W., and HODAS, S.: Hydroxyurea. Inhibitory effect on DNA metabolism.
Science 146: 1172-1174, 1964
- YOUNG, C.W., SCHOCHETMANN, G., and KARNOFSKY, D.A.: Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis. Studies in intact cells
Cancer Res. 27: 526-534, 1967
- YU, C.K., and SINCLAIR, W.K.: Cytological effects on Chinese Hamster cells of synchronising concentrations of hydroxyurea.
J. Cell Physiol. 72: 39-42, 1968
- ZALOKAR, M.: Nuclear origin of ribonucleic acid.
Nature 183: 1330-1332, 1959

LEBENS LAUF

=====

08. April 1956	geboren in Halle/Saale als erstes Kind des Diplom-Landwirts Dr. Rudolf Lörz und seiner Ehefrau Sabine
1963 - 1971	Volksschule und Gymnasium in Kehl/Rhein
1971 - 1975	Gymnasium in Kempten/Allgäu
Juni 1975	Abitur am Allgäu-Gymnasium in Kempten
1975 - 1981	Studium der Humanmedizin in München (Ludwig-Maximilians-Universität), Wien und Basel
Oktober 1981 - September 1982	Praktisches Jahr im Städt. Krankenhaus München-Neuperlach (Innere Medizin), im Kantonsspital Basel (Chirurgie) und im Klinikum Großhadern (Radiologie)
Dezember 1982	3. Teil der ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
seit Januar 1983	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für experimentelle Pathologie (Prof. Dr. H. Rabes) am Pathologischen Institut der Universität (Direktor Prof. Dr. M. Eder)

